



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

SANDRA JULIETH HENAO TORO

**ACRILAMIDA EM AÇÚCAR NÃO CENTRIFUGADO (RAPADURA) NA
AMÉRICA LATINA: VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM
MÉTODO LC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO NO BRASIL E NA
COLÔMBIA**

**ACRYLAMIDE IN NON-CENTRIFUGAL SUGAR FROM LATIN AMERICA
MARKETS: IN-HOUSE VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD AND
DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT IN BRAZIL AND COLOMBIA**

Campinas-SP

2020

SANDRA JULIETH HENAO TORO

**ACRILAMIDA EM AÇÚCAR NÃO CENTRIFUGADO (RAPADURA) NA
AMÉRICA LATINA: VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM
MÉTODO LC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO NO BRASIL E NA
COLÔMBIA**

**ACRYLAMIDE IN NON-CENTRIFUGAL SUGAR FROM LATIN AMERICA
MARKETS: IN-HOUSE VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD AND
DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT IN BRAZIL AND COLOMBIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Dissertation presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Science.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pavesi Arisseto Bragotto

Coorientador: Dr. Mateus Henrique Petrarca

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Sandra Julieth Henao Toro orientada pela Profa. Dra. Adriana Pavesi Arisseto Bragotto.

Campinas

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

H38a Henao Toro, Sandra Julieth, 1988-
Acrilamida em açúcar não centrifugado (rapadura) na América Latina : validação intralaboratorial de um método LC-MS/MS e avaliação da exposição no Brasil e na Colômbia / Sandra Julieth Henao Toro. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Adriana Pavesi Ariseto Bragotto.
Coorientador: Mateus Henrique Petrarca.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Contaminantes - Processamento. 2. Reação de Maillard. 3. Avaliação do risco. 4. Rapadura. I. Bragotto, Adriana Pavesi Ariseto. II. Petrarca, Matheus Henrique. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Acrylamide in non-centrifugal sugar from Latin America markets : in-house validation of an LC-MS/MS method and dietary exposure assessment in Brazil and Colombia

Palavras-chave em inglês:

Contaminants - Processing

Maillard reaction

Risk assessment

Rapadura

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Pavesi Ariseto Bragotto [Orientador]

Flavio Luis Schmidt

Silvia Amelia Verdiani Tfouni

Data de defesa: 23-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2427-1783>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4360577599668838>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Presidente da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Pavesi Arisseto Bragotto
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Silvia Amélia Verdiani Tfouni
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA)
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Sobre cair e levantar de novo,
falhar e começar de novo,
seguir um caminho e ter que trocar,
encontrar dor e ter que lidar com isso.
Não chame isso de adversidade, chame isso sabedoria.

Sobre passar dias radiantes juntos,
dias felizes e dias tristes,
dias de solidão e dias de companhia.
Não chame isso de rotina, chame de experiência.

No que seus olhos olham e seus ouvidos ouvem,
seu cérebro trabalha e suas mãos trabalham,
sua alma irradia, sua sensibilidade é sentida e seu coração ama.
Não chame isso de poder humano, chame de milagre divino ...

Anônimo

Aos meus pais, minha irmã, meus sobrinhos e meu namorado, que confiaram em mim e me apoiaram em todos os meus projetos. Aos meus colegas do laboratório de toxicologia de alimentos. Aos meus amigos e colegas do mestrado, me sinto muito afortunada de ter conhecido vocês. Aos professores com quem tive o prazer de aprender muito, em especial minha orientadora e meu coorientador, Profa. Dra. Adriana Pavesi e Dr. Mateus Petrarca, por serem inspiração para mim como profissional, pela sua paciência e orientação. Para Deus, o começo e o fim de todos os meus propósitos...

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O açúcar não centrifugado (ANC), também chamado de *rapadura* no Brasil ou *panela* na Colômbia, é tradicionalmente consumido como doce e/ou adoçante nas regiões que cultivam cana de açúcar e comercializado em forma de bloco ou granulado. Além do tratamento térmico (120-132 °C) como uma das etapas de produção, o caldo extraído da cana contém açúcares redutores e aminoácidos na composição, os quais favorecem a reação de Maillard resultando na formação de acrilamida, um composto potencialmente carcinogênico e genotóxico. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os níveis de acrilamida em amostras de ANC comercializadas em diferentes países da América Latina, incluindo Brasil, Colômbia, Equador, México, Bolívia e Peru. Para isso, um método analítico baseado no preparo de amostra QuEChERS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) foi validado, o qual apresentou limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, recuperações entre 84,3 e 107,5%, além de coeficientes de variação abaixo de 15%, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade. As 76 amostras de ANC analisadas apresentaram níveis de acrilamida que variaram entre <20 e 1414 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações mais altas foram encontradas nas amostras do Peru, Equador e Colômbia com médias de 636 ± 418 , 446 ± 337 e $401 \pm 278 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. As amostras comercializadas em forma granulada apresentaram uma média maior de conteúdo de acrilamida ($517 \pm 313 \mu\text{g kg}^{-1}$) quando comparadas com as de bloco ($294 \pm 262 \mu\text{g kg}^{-1}$). Além disso, as amostras da Colômbia classificadas como orgânicas apresentaram valores maiores ($721 \pm 217 \mu\text{g kg}^{-1}$) quando comparadas com as convencionais ($363 \pm 261 \mu\text{g kg}^{-1}$). As diferenças no nível de acrilamida nas amostras podem ser atribuídas a diversos fatores, como o tempo e temperatura utilizados no processo de elaboração, a composição inicial da cana de açúcar e o tipo de aglutinante empregado. A ingestão de acrilamida no Brasil para grandes consumidores de ANC, como o Estado do Ceará, foi estimada em 0,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (pc) dia^{-1} , enquanto que na Colômbia, crianças entre 1 e 4 anos da região Central apresentaram ingestão de 3,52 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc dia^{-1} no percentil 95. Embora este contaminante não deva representar uma preocupação em relação à neurotoxicidade, os valores da margem de exposição para efeitos neoplásicos são baixos e sugerem atenção.

Palavras-chave: Contaminante de processamento; reação de Maillard; avaliação do risco; rapadura.

ABSTRACT

Non-centrifugal sugar (NCS), also called *rapadura* in Brazil or *panela* in Colombia, is traditionally consumed as a sweet and/or sweetener in regions that cultivate sugar cane and sold in block or granulated forms. In addition to the heat treatment (120-132 °C) as one of the production steps, the juice extracted from sugarcane contains reducing sugars and amino acids in the composition, which favor the Maillard reaction resulting in the formation of acrylamide, a potentially carcinogenic and genotoxic compound. Thus, the objective of this work was to evaluate the levels of acrylamide in NCS samples sold in different countries in Latin America, including Brazil, Colombia, Ecuador, Mexico, Bolivia and Peru. For that, a liquid chromatography tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) preceded by a rapid and simple QuEChERS-based sample preparation was validated, which presented a limit of detection (LOD) and a limit of quantification (LOQ) of 10 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, recoveries between 84.3 and 107.5%, and coefficients of variation below 15% under conditions of repeatability and reproducibility. The 76 NCS samples analyzed showed acrylamide levels that varied between <20 and 1414 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The highest concentrations were found in the samples from Peru, Ecuador and Colombia with averages of 636 ± 418 , 446 ± 337 and 401 ± 278 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The samples sold in granulated form had a higher average of acrylamide content (517 ± 313 $\mu\text{g kg}^{-1}$) when compared to the block (294 ± 262 $\mu\text{g kg}^{-1}$). In addition, samples from Colombia classified as organic showed higher values (721 ± 217 $\mu\text{g kg}^{-1}$) when compared to conventional samples (363 ± 261 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The differences in the level of acrylamide in the samples can be attributed to several factors, such as the time and temperature used in the elaboration process, the initial composition of the sugarcane and the type of flocculant used. The intake of acrylamide in Brazil for high NCS consumers, such as the State of Ceará, was estimated at 0.02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight (bw) day^{-1} , while in Colombia, children between 1 and 4 years of age from the Central region showed an intake of 3.52 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw day^{-1} in the 95th percentile. Although this contaminant should not represent a concern in relation to neurotoxicity, the margin of exposure values for neoplastic effects are low and suggest attention.

Keywords: Process contaminant; Maillard reaction; risk assessment; rapadura.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Produção global de açúcar não centrifugado.....	20
Figura 2. Processo de elaboração de açúcar não centrifugado.....	22
Figura 3. Aglutinantes naturais.....	24
Figura 4. Estrutura química da acrilamida.	29
Figura 5. Mecanismo proposto da reação de Maillard para a formação de acrilamida a partir de asparagina e açúcar redutor.	33
Figura 6. Rotas alternativas de formação de acrilamida.	34
Figura 7. Esquema proposto das principais vias metabólicas da acrilamida.	36
Figura 8. Técnicas de mitigação de acrilamida.	41
Figura 9. Esquema geral para a análise da acrilamida.	45

CAPÍTULO 2 – ACRYLAMIDE IN NON-CENTRIFUGAL SUGAR FROM LATIN AMERICA MARKETS: IN-HOUSE VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD AND DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT IN BRAZIL AND COLOMBIA.

Figure 1. Chromatogram and mass spectrum with precursor and product ions of a standard solution of (A) acrylamide and (B) valine in solvent at a concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72
Figure 2. Acrylamide content in non-centrifugal sugar ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Values are mean \pm deviation. Dotted lines indicates the median (P50) and the 90th percentile (P90).....	75
Figure 3. Acrylamide content in non-centrifugal sugar commercially available as block or granulated.	78
Figure 4. Acrylamide content in organic and conventional Colombian non-centrifugal sugar.	79

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Composição média da cana de açúcar.	18
Tabela 2. Variações de temperatura e de concentração para o controle do ponto final de diferentes tipos de produtos não centrifugados.	19
Tabela 3. Nomes do açúcar não centrifugado (ANC).	20
Tabela 4. Composição química/nutricional média do ANC.	21
Tabela 5. Características físico-químicas do ANC.	28
Tabela 6. Ocorrência de acrilamida em alimentos de diferentes países.	30
Tabela 7. Ocorrência de acrilamida em açúcares.	31
Tabela 8. Resultados resumidos da caracterização do risco para acrilamida em alimentos.	40
Tabela 9. Estratégias de mitigação da acrilamida em alimentos.	42
Tabela 10. Níveis de referência para a presença de acrilamida.	43
Tabela 11. Determinação de acrilamida em diferentes matrizes empregando o método de preparo de amostra QuEChERS.	48

CAPÍTULO 2 – ACRYLAMIDE IN NON-CENTRIFUGAL SUGAR FROM LATIN AMERICA MARKETS: IN-HOUSE VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD AND DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT IN BRAZIL AND COLOMBIA.

Table 1. Method validation parameters for acrylamide quantification in non-centrifugal sugar by LC-MS/MS.	74
Table 2. Occurrence of acrylamide in non-centrifugal sugar.	76
Table 3. Consumption of non-centrifugal sugar and intake for the Brazilian population.	80
Table 4. Consumption of non-centrifugal sugar and acrylamide levels used to estimate exposure for the Colombian population.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC / NCS: Açúcar não centrifugado / Non-centrifugal sugar

BMDL₁₀: Dose que produziu uma resposta adversa baixa, mas mensurável em 1-10% da população

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAC: Codex Alimentarius Commission

EC: European Commission / Comissão Europeia

EFSA: European Food Safety Authority / Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EUA: Estados Unidos de América

FAO: Food and Agriculture Organization / Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GSH: Glutathione

IARC: International Agency for Research on Cancer / Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives / Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares

LI: Limite inferior mínimo

LOD: Limit of detection / Limite de detecção

LOQ: Limit of quantitation / Limite de quantificação

LS: Limite superior máximo

MgSO₄: Sulfato de magnésio

MOE: Margem de exposição

NaCl: Cloreto de sódio

NOAEL: Nível sem efeito adverso observado

NOEL: Nível sem efeito observável

p.c. / b.w.: Peso corpóreo / body weight

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe / Rápido, fácil, econômico, eficaz, robusto e seguro.

LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry/ Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1. Cana de açúcar.....	17
2. Produtos elaborados a partir do caldo de cana de açúcar.....	18
3. Açúcar não centrifugado	19
3.1. Processamento de açúcar não centrifugado	22
4. Acrilamida.....	29
4.1. Acrilamida em alimentos	29
4.1.1. Ocorrência	29
4.1.2. Mecanismo de formação	32
4.1.3. Aspectos toxicológicos e riscos à saúde	35
4.1.4. Mitigação.....	41
4.1.5. Aspectos regulatórios.....	43
4.1.6. Determinação de acrilamida em alimentos	44
5. Conclusão	49
6. Referências Bibliográficas	50
CAPÍTULO 2 – ACRYLAMIDE IN NON-CENTRIFUGAL SUGAR FROM LATIN AMERICA MARKETS: IN-HOUSE VALIDATION OF AN LC-MS/MS METHOD AND DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT IN BRAZIL AND COLOMBIA.....	62
Abstract	64
1. Introduction	65
2. Material and methods.....	67
2.1. Analytical standards	67
2.2. Reagents and consumables.....	67
2.3. Samples	67
2.4. Sample preparation	67

2.5. LC-MS/MS analysis	68
2.6. Method validation.....	69
2.7. Exposure assessment and risk characterization.....	69
2.8. Statistical analysis	71
3. Results and discussion.....	72
3.1. Method performance characteristics.....	72
3.2. Acrylamide levels in non-centrifugal sugar (NCS).....	74
3.3. Estimate of acrylamide intake and risk characterization from non-centrifugal sugar (NCS) consumption for the Brazilian and Colombian population.....	80
4. Conclusion.....	84
References	85
CONCLUSÃO GERAL	91
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

INTRODUÇÃO GERAL

Açúcar não centrifugado (ANC), tecnicamente nomeado assim pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (FAO, 1994), é o produto sólido obtido a partir da evaporação, concentração e cristalização do caldo de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) até uma concentração maior que 90 °Brix, cujo processo de elaboração pode variar de país para país (FAO, 2014). Ao contrário do açúcar refinado, seu processo de elaboração não inclui a etapa de centrifugação onde são separados os cristais de sacarose dos outros componentes do caldo. O ANC pode ser conhecido por diferentes nomes como *jaggery* (Sul de Ásia), *panela* (Colômbia, Equador), *rapadura* (Brasil), *muscovado* (Filipinas) e *kokuto* (Japão) e tem sido consumido, tradicionalmente, como doce ou adoçante nas regiões produtoras de cana de açúcar e comercializado em forma de bloco ou granulado (JAFFÉ, 2013).

O principal produtor mundial de ANC é a Índia, seguida pela Colômbia (FAOSTAT, 2017), a qual ocupa o primeiro lugar em termos de consumo per capita (19 quilos/ano), uma vez que 87% da população colombiana incluem ANC na lista de compras (DINERO, 2014). Em países como a Colômbia, o produto é dissolvido em água e então consumido como uma bebida chamada “aguapanela ou agua de panela”, podendo também ser misturado com leite e oferecido às crianças nas mamadeiras (VARGAS, 2016). Já no Brasil, a rapadura é popularmente consumida de forma direta sem diluição e, inclusive, está inserida na merenda escolar em alguns estados do Nordeste, como Ceará, Paraíba e Pernambuco (EMBRAPA, s.d). Atualmente, produtores colombianos têm exportado ANC para países como Coreia do Sul, Espanha, Itália, Austrália, Canadá, Estados Unidos e Argentina. Particularmente, do ponto de vista nutricional, ANC tem se destacado em relação ao açúcar convencional pela alta concentração de minerais, alguns compostos fenólicos, proteínas e vitaminas (INS, 2012).

A cana de açúcar apresenta diferentes compostos nitrogenados em sua composição, incluindo aminoácidos, amidas, oligopeptídeos e proteínas em menor proporção, sendo os aminoácidos livres, em destaque a asparagina, os que permanecem no caldo de cana. Também, destacam-se os açúcares redutores glicose e frutose, cuja concentração pode aumentar significativamente durante a preparação do ANC devido à hidrólise da sacarose (INS, 2012). Consequentemente, a elevada concentração de açúcares redutores e a presença de asparagina, em condições de processamento sob

temperaturas acima de 120 °C, pode levar à formação de compostos de interesse toxicológico como a acrilamida (ARISSETO; TOLEDO, 2006). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a acrilamida é classificada como um provável carcinógeno humano (grupo 2A) (IARC, 1994).

A acrilamida é considerada uma questão de interesse para a saúde pública devido a sua ocorrência em alimentos de consumo comum, como batata frita, cereais matinais e pães. De acordo com Barón (2016), o ANC foi o produto que mais contribuiu para a exposição média da população da cidade de Bogotá, na Colômbia, à acrilamida. Desde sua descoberta em 2002, pesquisas relacionadas com o mecanismo de formação desse contaminante, estimativas de consumo e novas metodologias analíticas para sua determinação em diferentes matrizes estão sendo desenvolvidas a fim de minimizar sua presença em alimentos (PAN et al., 2020).

Diferentes métodos analíticos foram publicados e a seleção da metodologia apropriada é baseada principalmente no tipo de produto alimentício (matriz de amostra), estrutura e propriedades da acrilamida (ORACZ; NEBESNY; ZYZELEWICZ, 2011), mas as técnicas mais utilizadas são cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), tendo a última grandes vantagens, como alta reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, além de requerer menor tempo de análise e, em termos gerais, protocolos "mais simples" do que os métodos de derivatização para análise por GC-MS (GÖKMEN, 2016).

Existem poucos artigos científicos que descrevem a metodologia de preparo de amostras para análise de acrilamida em ANC. Eles usam principalmente soluções para precipitação de proteínas e açúcares, além de extração em fase sólida (SPE) para o processo de limpeza (GÓMEZ-NARVÁEZ et al., 2019; MESIAS et al., 2020). O preparo de amostras à base de QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro), método de extração e limpeza proposto por Anastassiades et al. (2003) para análise de resíduos de agrotóxicos, já foi relatado para a determinação de acrilamida em algumas matrizes (MASTOVSKA; LEHOTAY, 2006; ANDAČIĆ et al., 2020; DIBABA et al., 2018; SURMA et al., 2017; PETRARCA et al., 2017); no entanto, essa abordagem não foi aplicada para ANC até o presente.

Alimentos ricos em carboidratos têm sido os principais produtos investigados quanto à ocorrência de acrilamida; no entanto, ainda há poucos estudos sobre os níveis deste contaminante em ANC, cujos dados disponíveis até o momento são basicamente provenientes de países como Colômbia, Peru, China e Japão. Nesse contexto, o presente projeto de pesquisa é pioneiro em avaliar e comparar os níveis de acrilamida em ANC produzido e comercializado em diferentes países da América Latina, incluindo Brasil, Colômbia, Equador, México, Bolívia e Peru, através do desenvolvimento de um método analítico baseado no preparo de amostra QuEChERS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), além de ser o primeiro trabalho que faz um estudo preliminar da exposição à acrilamida através da rapadura no Brasil.

O Capítulo 1 desta dissertação trata-se de uma revisão bibliográfica sobre o açúcar não centrifugado e a acrilamida. São apresentadas as principais características da cana de açúcar, o caldo de cana de açúcar e sua composição, os produtos elaborados a partir do caldo de cana, o açúcar não centrifugado e seu processamento, a acrilamida, a sua ocorrência em alimentos, o mecanismo de formação, os aspectos toxicológicos, além dos riscos à saúde, as estratégias de mitigação e os métodos analíticos.

O Capítulo 2 apresenta um artigo a ser submetido para a revista “*Food Additives & Contaminants*”, da editora Taylor & Francis. Nele estão contemplados todos os resultados obtidos nos experimentos realizados ao longo do curso de mestrado.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cana de açúcar

A cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é a maior cultura do mundo em quantidade de produção, com 1,8 bilhão de toneladas produzidos em 2017, sendo que o Brasil representa 40% do total mundial (FAOSTAT, 2017). Em 2012, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estimou que cerca de 26 milhões de hectares (64 milhões de acres), em mais de 90 países, cultivavam a cana de açúcar, que é utilizada principalmente para a produção de açúcar e etanol. Os produtos à base de açúcares provenientes da cana de açúcar podem ser classificados em três grandes grupos: i) açúcar centrifugado cru; ii) açúcar refinado; e iii) açúcar não centrifugado (ANC) (FAO, 1994).

A cana de açúcar é constituída basicamente por água (65 a 80%) e sólidos totais dissolvidos (20 a 35%). Dos sólidos totais, destacam-se os açúcares (sacarose, glicose e frutose), as substâncias nitrogenadas (aminoácidos livres, amidas, oligopeptídeos e proteínas em menor proporção, sendo os aminoácidos livres aqueles que permanecem no caldo da cana), os lipídeos (ceras), além de pectinas, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos inorgânicos, estes últimos representados pelas cinzas (INS, 2012).

A composição química média da cana de açúcar para elaboração de açúcar não centrifugado é apresentada na Tabela 1, destacando-se os aminoácidos com composição de 0,2% e asparagina caracterizada como amida em 0,07%. Foi demonstrado que a asparagina é o aminoácido predominante nos tecidos vegetais da cana de açúcar, com 72 a 85% do total de aminoácidos livres presentes (LOIRET et al., 2009). Da mesma forma, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico e prolina foram listados como os aminoácidos mais abundantes no caldo de cana (LOIRET et al., 2009; YANG & HUANG, 1983); no entanto, esta ponderação pode variar dependendo da variedade da planta, do tecido, da fertilização ou das suas interações endofíticas.

Tabela 1. Composição média da cana de açúcar.

Componentes	Média (%)	Componentes	Média (%)
Água	74,50	Aminoácidos (ácido aspártico)	0,20
Açúcares totais	14,00	Ácido nítrico	0,01
Sacarose	12,50	Fibra Total	10,00
Glicose	0,90	Gorduras e ceras	0,20
Frutose	0,60	Pectina e gomas	0,20
Substâncias nitrogenadas totais	0,40	Ácidos livres	0,08
Albuminas	0,12	Ácidos combinados	0,11
Amidas (asparagina)	0,07	Outros	0,51

Fonte: Adaptado de CIMPA (1992).

2. Produtos elaborados a partir do caldo de cana de açúcar

O caldo de cana ou garapa é o nome que se dá ao líquido extraído através do processo de moagem da cana de açúcar. É considerado um líquido viscoso, de aparência opaca e cor amarelo esverdeado, de composição química bastante complexa e variável (LIMA, 2012). A composição de açúcares redutores no caldo de cana varia de 4 a 8% (glicose e frutose) (LARRAHONDO, 1995), porém, durante o seu processamento, o teor de açúcares redutores pode aumentar devido à hidrólise ácida da sacarose.

A partir do caldo de cana é possível elaborar diferentes tipos de produtos como o açúcar mascavo, a rapadura, o melado e o açúcar refinado. Os três primeiros fazem parte dos chamados produtos não centrifugados e são obtidos através de métodos tradicionais como a evaporação e concentração do caldo de cana de açúcar, mas sem a inclusão da etapa de centrifugação onde são separados os cristais de sacarose dos outros componentes do caldo, o que a faz com que sua composição química contenha, além da sacarose, glicose e frutose, vários minerais importantes como cálcio, fósforo, ferro, potássio e magnésio, entre outros (RODRÍGUEZ, 2004). Já o açúcar refinado tem uma etapa de centrifugação além de um processo químico de branqueamento e refinamento (ALAVÉS, 2010).

O processamento do caldo de cana para a produção de açúcar mascavo, rapadura e melado segue praticamente o mesmo fluxograma, sendo utilizados os mesmos equipamentos e matéria prima. A diferença está na adição de insumos e no tempo em que se atinge o “ponto” (temperatura e concentração ideais) para obtenção de cada um dos três produtos como mostrado na Tabela 2 (EMBRAPA, 2014).

Tabela 2. Variações de temperatura e de concentração para o controle do ponto final de diferentes tipos de produtos não centrifugados.

Produto	Temperatura (°C)	Concentração (°Brix)
Melado	106 a 108	74 a 78
Rapadura	114 a 120	88 a 91
Açúcar mascavo	123 a 126	92 a 93

Fonte: EMBRAPA (2014).

Como descrito por Olimpio (2014), o processo produtivo do açúcar mascavo, rapadura e melado é típico da pequena produção agroindustrial, adotando técnicas, máquinas e equipamentos e modo de produção, quase em sua totalidade, arcaico, originando um produto de baixa qualidade. Todas as etapas da produção são realizadas de forma bastante artesanal, com pouquíssima incorporação tecnológica, recorrendo a processos manuais e, normalmente, com poucos cuidados com a qualidade e higiene. Além disso, muitos produtores não controlam a temperatura do processo e somente o “ponto” é determinado de forma experimental.

3. Açúcar não centrifugado

Açúcar não centrifugado (ANC), tecnicamente nomeado assim pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (FAO, 1994), é o produto sólido obtido a partir da evaporação, concentração e cristalização do caldo de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) até uma concentração maior que 90 °Brix (FAO, 2014; MESIAS et al., 2020).

Segundo dados da FAOSTAT (FAOSTAT, 2017), 32 países no mundo produzem ANC, sendo que a Índia é responsável por 60,4% de toda a produção mundial, acompanhada da Colômbia com 12,2% (Figura 1), que também é o maior consumidor do mundo com cerca de 19 quilos por habitante, por ano (ICBF, 2020). O Brasil é o quarto produtor mundial, com 494 mil toneladas e tem o consumo de 0,121 quilo por habitante, por ano (IBGE, 2011). A Tabela 3 mostra os diferentes nomes pelos quais o ANC é conhecido ao redor do mundo.

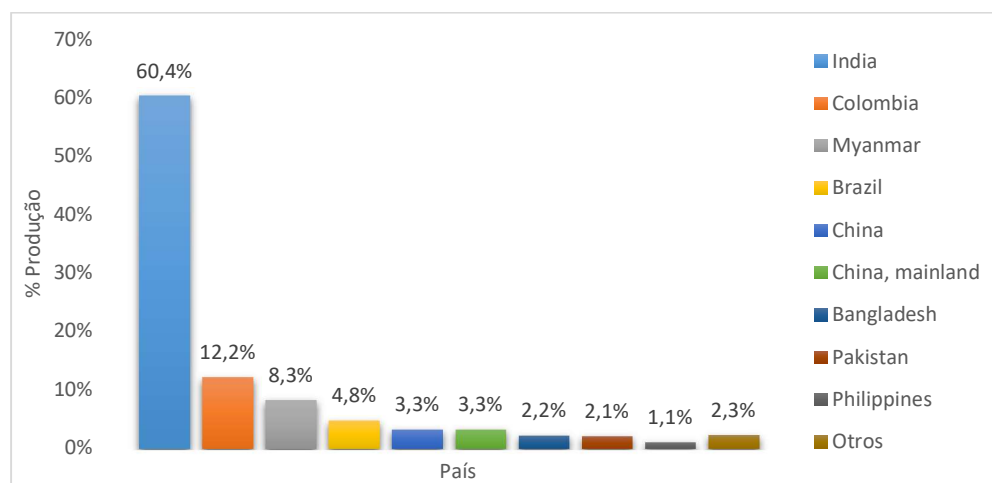


Figura 1. Produção global de açúcar não centrifugado. Adaptado de: FAOSTAT (2017).

Tabela 3. Nomes do açúcar não centrifugado (ANC).

Região	País	Nome
Ásia	Índia, Paquistão	Jaggery, Gur
	Tailândia	Namtan Tanode
	Japão	Kokuto, Black sugar (Kuro Sato)
	Filipinas	Moscavado, Panocha, Panutsa
América Latina	México	Piloncillo
	Guatemala	Panela, Rapadura
	Costa Rica, Nicarágua	Tapa dulce, Dulce
	Panamá	Panela, Raspadura
	Colômbia, Equador	Panela
	Venezuela	Papelón, Panela
	Peru, Bolívia	Chancaca
	Brasil	Rapadura
	Argentina	Azúcar integral, Azúcar panela
África	Nigéria, Quênia, África do Sul	Jaggery
	Países de língua swahili	Sukari Njumru
Europa, América do Norte	Reino Unido	Unrefined muscovado
	França	Cassonade
	Alemanha	Vollrohrzucker
	EUA	Raw sugar, Evaporated cane juice, Unrefined sugar

Fonte: JAFFÉ (2013).

O ANC é consumido como doce e adoçante na maioria das regiões que cultivam cana de açúcar no mundo. Em países como a Colômbia, o produto é consumido como uma bebida chamada “aguapanela ou agua de panela”, podendo também ser misturado com leite e oferecido às crianças nas mamadeiras (VARGAS, 2016). Já no Brasil, a rapadura é popularmente consumida de forma direta sem diluição e, inclusive, está inserida na merenda escolar em alguns estados do Nordeste, como Ceará, Paraíba e Pernambuco (EMBRAPA, s.d).

Ao ANC foram atribuídas propriedades benéficas para a saúde como capacidade antioxidante, devido à retenção de grande quantidade de compostos fenólicos e flavonoides do caldo de cana (VELASQUEZ et al., 2019; ASIKIN et al., 2016; COLINA et al., 2012; PAYET; SING; SMADJA, 2005); de proteção contra a oxidação do DNA (HARISH NAYAKA et al., 2009; KADAM et al., 2008) e prevenção de doenças do pulmão (SAHU; PAUL, 1998; SOLÍS et al., 2006). Além disso, o ANC tem o maior teor de policosanol e aldeído de cadeia longa, que são componentes que podem ter efeitos benéficos na saúde humana (WEERAWATANAKORN et al., 2016). A sua composição química é encontrada na Tabela 4.

Tabela 4. Composição química/nutricional média do ANC.

Componentes	Média	Componentes	Média
Umidade (g/100g)	7,0	Minerais (mg/100g)	
Carboidratos (g/100g)	88,3	Potássio	116,7
Sacarose	79,4	Cálcio	172,8
Açúcar invertido	8,5	Magnésio	61,7
Substâncias nitrogenadas (g/100g)		Fósforo	60,4
Nitrogênio total	0,1	Sódio	56,0
Proteína	0,5	Ferro	5,3
Gorduras Totais (g/100g)	0,2	Manganês	1,2
Fibra Alimentar (g/100g)	0,2	Zinco	1,5
Cinzas (g/100g)	1,3	Flúor	5,7

Fonte: CORPOICA, 2004.

As tendências globais para diminuir o consumo de alimentos industrializados favorecem o ressurgimento deste adoçante natural. Neste sentido, o desenvolvimento de novas apresentações e melhora da qualidade do produto representam algumas das estratégias para promover o seu uso (MUJICA; GUERRA; SOTO, 2008).

3.1. Processamento de açúcar não centrifugado

Apesar de variar de país para país, o processo de fabricação do ANC consiste, de maneira geral, na moagem da cana, clarificação e evaporação do caldo até obter um mel concentrado (mais de 90 °Brix), que é batido, moldado e resfriado para atingir a solidificação (MESIAS et al., 2020, FAO, 2014). A Figura 2 apresenta o fluxograma do processo de elaboração de ANC, o qual divide-se nas etapas descritas a seguir.

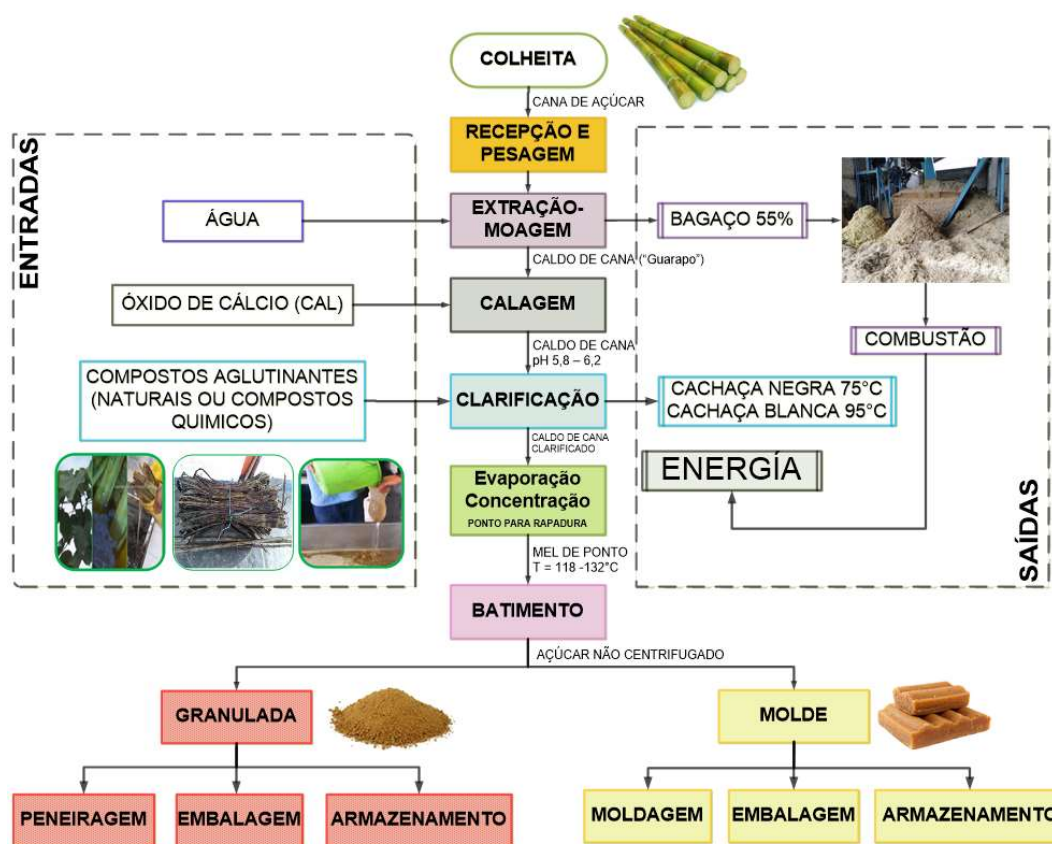


Figura 2. Processo de elaboração de açúcar não centrifugado. Adaptado de INS (2012).

Colheita: Esta etapa corresponde às operações de corte, transporte e armazenamento da cana. Segundo Osorio (2007), a duração dessa operação deve ser no máximo de três dias, para evitar a desidratação do caule (ou colmo) e a aceleração no desdobramento da sacarose (glicose e frutose), o que provoca uma diminuição na produção e na qualidade do ANC. Segundo Dezfuly, Mahadevaiah e Demappa (2013), se a cana for moída após 24 horas, o pH do caldo será reduzido, o que propicia a inversão

da sacarose e gera um maior consumo de aglutinantes durante a etapa de clarificação, tornando a fabricação mais cara.

Recepção e pesagem: A cana de açúcar é recebida e pesada, para que o rendimento do processo seja estimado.

Extração - Moagem: A cana passa por um preparo onde ocorre sua desintegração para facilitar a extração do caldo contido nas células, utilizando equipamentos chamados desfibradores. Em seguida, o material é passado por um engenho para extração do caldo (também conhecido como "garapa"), que tem um mínimo de 45% do peso da cana que entrou na moagem sendo que, nesta fase, pode haver adição de água para aumentar a eficiência do processo e facilitar a extração de sacarose (VELASQUEZ et al., 2019). O resíduo sólido resultante desta etapa é conhecido como bagaço, que é usado como combustível para as caldeiras a vapor depois de perder parte de sua umidade restante quando é seco ao ar livre (SATÍN, 2018).

Calagem: Para facilitar o processo de clarificação, a acidez do caldo é ajustada para um pH entre 5,8 e 6,2 pela adição de óxido de cálcio (leite de cal), hidróxido de sódio ou carbonato de sódio (VELASQUEZ et al., 2019), pois estas substâncias contribuem para a aglomeração dos sólidos, garantem a cristalização e evitam que a sacarose se decomponha e se transforme em açúcares redutores (SATÍN, 2018). Dada a sua composição química complexa, o seu aquecimento sem correção dessa acidez provoca um escurecimento demasiado do produto. Nas instalações mais simples (pequenos engenhos), normalmente, não se faz a correção da acidez do caldo de cana (PAES; FERNANDES; BARBOSA, 2003).

Clarificação: O objetivo dessa etapa é eliminar a quantidade máxima de impurezas presentes no caldo de cana (folhas, bagacilho, proteínas coaguladas e ceras, dentre outras), visando obter um caldo claro, límpido e brilhante, que permita a produção de ANC de qualidade e de coloração mais clara e atrativa. A limpeza dos caldos ocorre através da coagulação, floculação e precipitação dos coloides e substâncias corantes, eliminadas por decantação e filtração (LIMA, 2012). A eliminação de material estranho é de especial importância na fabricação de ANC granulado, uma vez que constitui uma barreira para a cristalização (DEZFULY; MAHADEVIAH; DEMAPPA, 2013).

A clarificação do caldo envolve um efeito combinado de aquecimento e ação de alguns compostos aglutinantes. Dentre esses compostos, podem ser utilizados aglutinantes naturais como balso (*Heliocarpus americanus* L), cadilho (*Triumpheta lapputa* L), guásimo (*Guazuma ulmifolia*) (Figura 3) ou cinza da casca de café, que são mucilagens vegetais obtidas de caules, folhas e/ou frutos de algumas plantas naturais. Estes compostos são macerados e misturados com a água, formando uma substância mucilaginosa que, quando aplicada ao caldo de cana quente, aglutina e flocula as impurezas contidas nele (VELÁSQUEZ et al., 2019). Além de compostos naturais, existem aglutinantes artificiais de cadeia longa, como a poliacrilamida.

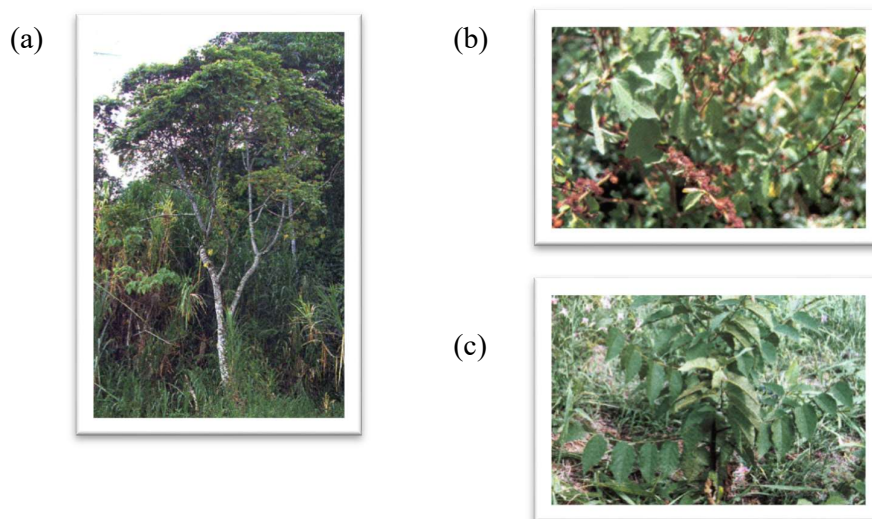


Figura 3. Aglutinantes naturais: (a) Balso (*Heliocarpus americanus* L); (b) Cadilho (*Triumpheta lapputa* L); (c) Guásimo (*Guazuma ulmifolia*). Fonte: LOPEZ; OSORIO, 2004.

Segundo Ortiz et al. (2011), os três aglutinantes naturais (balso, cadilho e guásimo) são constituídos principalmente de carboidratos (frutose, glicose e maltose), saponina, fenóis, além de minerais como ferro, cálcio e fosfato. Em ordem de retenção de sólidos solúveis, o melhor desempenho é gerado pelo balso, seguido pelo cadilho e pelo guásimo. A desvantagem desse tipo de aglutinante reside em sua curta vida útil devido à deterioração microbiológica gerada pelas condições de temperatura e umidade do ambiente; além disso, essas plantas estão em risco de extinção devido ao seu uso indiscriminado, o que causou um impacto ambiental negativo e gerou um alto custo (QUEZADA-MORENO; GALLARDO-AGUILAR, 2014). Devido à isso, são utilizadas

substâncias de origem sintética, como a poliacrilamida, que apresenta melhores resultados em relação à retenção de sólidos insolúveis, tempo de sedimentação e turbidez (DEZFULY; MAHADEVAIAH; DEMAPPA, 2013).

Os compostos aglutinantes são adicionados em duas partes e em proporções iguais: em primeiro lugar, quando o caldo atinge uma temperatura entre 60 e 70 °C, e o segundo quando atinge 75-92 °C (MOSQUERA; CARRERA; VILLADA, 2007). Em seguida, os sólidos solúveis se aglomeram e formam uma camada de impurezas chamada "cachaça" na superfície, que é removida manualmente com o auxílio de uma concha ou de uma escumadeira. A cachaça é de dois tipos:

- ✓ Cachaça Preta: é a camada inicial de impurezas e é removida a 75 °C.
- ✓ Cachaça Branca: é a segunda camada formada, é mais leve e deve ser removida antes que os caldos atinjam a temperatura de ebulição. A remoção da cachaça branca é feita a 95 °C.

Existem processos de clarificação nos quais não são utilizados compostos aglutinantes; estes consistem em peneirar o caldo extraído com peneira de malha fina (de inox, cobre ou mesmo nylon) para a retirada das impurezas grosseiras e, em seguida, deixá-lo em repouso por aproximadamente 15 minutos para decantação das impurezas remanescentes, aplicando a diferença de densidades existente entre as partículas sólidas em suspensão e o caldo como princípio para a separação (EMBRAPA, s.d ; SEBRAE, 2016). Proprietários de engenho vêm investindo na aquisição de decantadores, visando diminuir o tempo de decantação e o risco de fermentação do caldo, o que comprometeria a aparência do produto, e, também, facilitaria a operação de clarificação (OLIMPIO, 2014).

Evaporação – Concentração (Ponto para rapadura): O processo de evaporação-concentração pode acontecer em um mesmo tacho ou em até cinco tachos como nos engenhos mais modernos e, nessa etapa, o caldo é fervido para evaporar a água e concentrar os sólidos de 16-20 °Brix (inicial) a 90-94 °Brix (final), gerando um líquido amarelado e espesso (mel) que atinge uma temperatura média de 120 °C e um ponto ótimo de concentração de açúcares cristalizáveis, que permite melhor moldagem, secagem rápida e textura fina no ANC. Este ponto é conhecido como ponto para rapadura ou ponto de bala, e a experiência é necessária para determiná-lo, pois, geralmente, as pequenas

propriedades não possuem termômetros e os produtores visualizam o momento final do cozimento por meio da obtenção do ponto de bala.

O ponto de bala é obtido entre 100 °C e 102 °C, o que corresponde a uma percentagem de sólidos solúveis entre 66 e 70 °Brix. Para o ANC, o ponto é alcançado entre 118 °C e 132 °C, o que corresponde a uma concentração de sólidos solúveis de 88 a 96 °Brix. De forma geral, os caldos concentrados para ANC em bloco alcançam o ponto de bala entre 120 e 130 °C e, para ANC granulado, entre 126 a 132 °C (ROZO, 2013). Essas temperaturas podem variar até 2 °C, devido à altitude do local de fabricação, à pureza do caldo concentrado, tipo de tecnologia, eficiência energética e condições de operação (VELASQUEZ et al., 2019). Algumas características importantes para estabelecer o ponto de bala são: mel que escoar lentamente ou mel que, quando submerso em água fria, cristaliza e não se rompe facilmente.

Durante a etapa de evaporação e concentração do caldo de cana acontecem uma série de reações químicas complexas como a caramelização e a reação de Maillard que fornecem a cor e o aroma desejáveis para a aceitação do produto (SANTAMARÍA, 2012), mas que podem estar associadas à geração de compostos potencialmente tóxicos (VARGAS et al., 2014; MESIAS et al., 2020) como a acrilamida ou o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural. A acrilamida, produz efeitos neurotóxicos e potencialmente carcinogênicos e genotóxicos (EFSA, 2015) e o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural têm efeitos genotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos, danificadores de DNA e inibidores de enzimas (MESIAS et al., 2020; SUNG et al., 2020; GÓMEZ-NARVÁEZ et al., 2019).

Batimento: A massa cozida é retirada do tacho e é colocada em cochos de madeira, sendo agitada lentamente com o uso de uma régua de madeira ou de uma espátula, até esfriar. Esta agitação tem alguns objetivos (PAES; FERNANDES; BARBOSA, 2003):

- ✓ Resfriar: ao mexer, apressa-se o resfriamento da massa;
- ✓ Formar liga: a massa é uma mistura de açúcares (sacarose, glicose, frutose), além de sais minerais e ácidos, entre outros, que são aglutinados pela agitação, garantindo um ANC com estrutura mais fina e homogênea (cristais menores). Com uma agitação incompleta, o ANC, ao ser partido, apresenta manchas de cores diferentes e se mostra mais áspero na boca, o que é indesejável.
- ✓ Clarear o produto: com a agitação, incorpora-se ar à massa, tornando-a mais clara.

Após o processo de batimento, ANC em bloco e granulado podem ser obtidos para comercialização. O ANC granulado é uma nova apresentação com grande potencial de consumo, pois apresenta vantagens em relação ao ANC em bloco, como sua fácil dosagem, maior estabilidade no armazenamento e maior solubilidade.

Peneiragem: Para o ANC granulado, é o processo no qual as partículas grandes são separadas das menores, classificando-as por agitação, usando uma malha de aço.

Moldagem: Para o ANC em bloco, com o auxílio de uma concha, a massa é transferida para formas (quadradas, retangulares, semiesféricas, trapezoidais) que conferem a modelagem do produto, onde o mesmo é deixado esfriar completamente.

Embalagem: Após o resfriamento, o ANC é retirado da forma e embalado em quantidades que variam de 250g a 1,5kg dependendo da região de produção e do mercado a que se destina, evitando a presença de ar entre sua superfície e a embalagem, para não haver perda de qualidade do produto final. O ANC em bloco é embalado em filme plástico termoencolhível e o ANC granulado em sacos de polietileno para posteriormente serem embalados em caixas de papelão. Assim, o produto deve ser embalado individualmente, constando no rótulo todas as informações exigidas pelos órgãos responsáveis pela fiscalização de produtos alimentícios, a exemplo do nome do fabricante, datas de produção e validade, composição básica, entre outras.

Armazenamento: O ANC é um produto com propriedades higroscópicas, o que significa que absorve ou perde umidade do (ou para o) meio ambiente, o que promove atividade microbiana, desencadeando a degradação bioquímica que é refletida na produção de açúcares invertidos, levando à perda de estrutura, textura e dureza (VELASQUEZ et al., 2019). Portanto, deve ser armazenado em locais frescos e secos. Se o ANC possuir entre 7 e 9% de umidade, ele deve ser distribuído e consumido rapidamente, pois o armazenamento prolongado diminui sua qualidade.

A Tabela 5 apresenta os requisitos de qualidade descritos no projeto de regulamentação para açúcar não centrifugado no qual está trabalhando a Comissão do Codex Alimentarius (CL 2019/34-CS) (CAC, 2019).

Tabela 5. Características físico-químicas do ANC.

Características	Composição em base seca	
	Mínimo	Máximo
Cinzas (% m/m)	0,9	-
Sacarose (% m/m)	-	91,0
Açúcares redutores (% m/m)	5,3	-
Proteínas, em % (N x 6,25)	0,2	-

Umidade	Máximo
Bloco (%)	9,0
Granulado (%)	5,0

Fonte: CAC, 2019

Nota: A umidade é um fator diferenciador entre as formas de apresentação e a composição final dos sólidos, no produto em bloco e granulado.

4. Acrilamida

A acrilamida é um sólido branco cristalino, incolor e inodoro, de fórmula química C_3H_5NO (Figura 4) e peso molecular 71,08 g/mol, estável a temperatura ambiente, solúvel em água, etanol, metanol, dimetil éter e acetona, e insolúvel em benzeno e heptano (IARC, 1994). Fazem parte de sua estrutura química uma função amida polar, que confere a característica de alta solubilidade em água, e uma função vinil, que permite a polimerização (ARISSETO; TOLEDO, 2006). A acrilamida também é conhecida como 2-propenamida (EFSA, 2015).

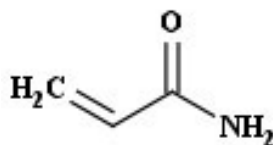


Figura 4. Estrutura química da acrilamida.

A acrilamida está presente na fumaça do cigarro, cosméticos e produtos de higiene pessoal e comercialmente é utilizada na produção e síntese de poliacrilamida, que é empregada como floculante para clarificação de água potável e tratamento de águas residuais (EC, 2002).

4.1. Acrilamida em alimentos

4.1.1. Ocorrência

Em 2002, a Agência Nacional Sueca de Alimentos e pesquisadores da Universidade de Estocolmo comunicaram a formação de altos níveis de acrilamida durante o processamento térmico de diversos alimentos como batata frita, batata chips, cereais matinais e pão (TAREKE et al., 2002). Esta descoberta despertou uma grande preocupação do ponto de vista de saúde pública e uma necessidade de monitorar e coletar dados sobre a ocorrência da acrilamida nos alimentos, uma vez que a acrilamida é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como provável carcinógeno humano (Grupo 2A) (IARC, 1994). A Tabela 6 apresenta um resumo dos resultados obtidos em vários países.

Tabela 6. Ocorrência de acrilamida em alimentos de diferentes países.

País	n*	Mínimo- Máximo (µg/kg)	Alimentos com maior teor de acrilamida	Referência
Espanha	60	<20-639	Cereais matinais com Kamut, cereais matinais com espelta, cereais matinais com trigo	MESIAS et al. (2019)
Índia	51	371-6391	Batata chips, Snacks estrudados	PAL et al. (2018)
Colômbia	506	0,3-2762	ANC, batata chips, batatas fritas	INVIMA (2018)
Japão	2750	0,4-5500	Batata chips, açúcar mascavo, batata frita, biscoitos	KAWAHARA et al. (2018)
Estônia	346	<30-3300	Batata chips, Snacks de cereal, biscoitos	ELIAS et al. (2017)
China	240	0,8-211,8	Batatas, açúcar, vegetais	GAO et al. (2016)
Europa	43419	24-1499	Substitutos de café, café, batata chips, batata frita	EFSA (2015)
Colômbia	155	<75-12626	Batata frita, café, mandioca frita, biscoitos, banana da terra frita	PACETTI et al. (2015)
Canadá	146	<10-2390	Batatas fritas, biscoitos, batata chips	NORMANDIN et al. (2013)
França	192	2-954	Batata chips, batata frita, biscoitos salgados	SIROT et al. (2012)
Global	11046	Máx. 5500	Cereais e produtos à base de cereal, batata chips, batata frita, raízes de chicória	JECFA (2011)
Polônia	225	11-3647	Batata chips, batatas fritas, biscoitos	MOJSKA et al. (2010)
Arábia Saudita	26	3,4-950	Berinjela grelhada (papa Ghanug), café solúvel, estrudados de milho, biscoitos (Korse Omer, tweel)	EL-ZINEY; AL- TURKI; TAWFIK (2009)
Turquia	311	<10-2336	Batata chips, milho chips, biscoitos, café, castanhas assadas e algumas sobremesas tradicionalis turcas	ÖLMEZ et al. (2008)
Brasil	111	<20-2528	Batatas fritas, batata chips, batata palha	ARISSETO et al. (2007)

*n = Número de amostras.

De modo geral, os resultados destas avaliações indicam que alimentos ricos em carboidratos submetidos a altas temperaturas apresentam altos níveis de acrilamida. Alimentos que não são fritos ou assados durante seu processamento ou preparação e

alimentos ricos em proteínas não apresentam níveis significativos de acrilamida, e tampouco a presença do contaminante é detectada em alimentos crus ou cozidos em água (PUNDIR; YADAV; CHHILLAR, 2019; LINEBACK; COUGHLIN; STADLER, 2012; ARISSETO; TOLEDO, 2006). Variações consideráveis têm sido observadas nos níveis de acrilamida em amostras da mesma categoria de alimentos em diferentes regiões, já que vários fatores, incluindo temperatura de aquecimento, métodos de cozimento e quantidades de carboidratos e aminoácidos, podem contribuir para a sua formação.

Considerando as informações disponíveis na literatura, constata-se que há poucos estudos sobre os níveis de acrilamida em açúcares e que os dados existentes até o momento são basicamente provenientes de países como Colômbia, Peru, China e Japão. A Tabela 7 apresenta um resumo dos resultados encontrados. Os valores sugerem que os níveis mais altos de acrilamida têm sido encontrados em ANC, com menores valores reportados em açúcar refinado.

Tabela 7. Ocorrência de acrilamida em açúcares.

Local de coleta	n*	Mínimo-Máximo (µg/kg)	Média (µg/kg)	Tipo de açúcar	Referência
Colômbia	4	<20-890	-	Amostras durante elaboração de ANC	MESIAS et al. (2020)
Colômbia-Itália-Peru-Espanha	40	60-3058	676	ANC	GÓMEZ-NARVÁEZ et al. (2019)
Peru	4	710-1257	863,8	ANC	SATÍN (2018)
Colômbia	84	29,1-2762,8	743,3	ANC	INVIMA (2018)
Japão	145	35-2325	386	Mascavo	KAWAHARA et al. (2018)
Japão	13	37-190	84	<i>Wasanbon</i>	KAWAHARA et al. (2018)
China	20	<1,2-180,6	20,8	ANC; Refinado	GAO et al. (2016)
Colômbia	30	297,3-873,2	520,7	ANC	BARÓN (2016)
Colômbia	7	ND-2200	-	Amostras durante elaboração de ANC	VARGAS et al. (2014)
China	12	<1,2-526,6	72,1	ANC; Refinado	ZHOU et al. (2013)
Global	24	Máx. 438	86	Refinado	JECFA (2011)
Global	52	Máx. 2300	445	ANC	JECFA (2011)
China	4	<3-1107	318,8	Mascavo; Refinado	CHENG et al. (2009)
China	8	ND-38	17,6	Refinado	OU et al. (2007)

*n = Número de amostras.

Segundo Mesías et al. (2020), o conteúdo de acrilamida aumenta ao longo do processo de fabricação de ANC, devido ao uso de temperaturas mais altas e a concentração relativa de sólidos nas amostras, assim como a perda no teor de umidade. Quantidades insignificantes de acrilamida (<LOQ) foram detectadas no caldo de cana cru e no caldo após a clarificação onde as temperaturas são menores do que 100 °C, mas após o processo de evaporação (>110 °C) e no produto em bloco (92,4 °Brix) que atingiu temperaturas >120 °C, foi observado um valor de 298 e 890 µg/kg respectivamente, enquanto os níveis de precursores diminuíram.

4.1.2. Mecanismo de formação

Os primeiros estudos demonstraram que a principal rota de formação da acrilamida nos alimentos é a reação de Maillard (Figura 5), uma importante reação química que leva ao escurecimento e à formação dos compostos de sabor e aroma associados com alimentos fritos, torrados ou assados (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002; STADLER et al., 2002; ZYZAK et al., 2003). Baixa umidade, alta temperatura e pH alcalino influenciam positivamente as reações (JECFA, 2011).

A acrilamida deriva, principalmente, da reação de segunda ordem entre açúcares redutores (via carbonila) e o grupo α -amino da L-asparagina livre, a qual é considerada o seu principal precursor (YAYLAYAN; WNOROWSKI; PEREZ, 2003; ZYZAK et al., 2003). Os N-glicosídeos ou base de Schiff podem sofrer rearranjo de Amadori, convertendo-se em dicarbonilas (1-desoxisona ou 3-desoxisona) via reações de enolização e desidratação/hidrólise. Estes compostos podem ainda se decompor na cascata de reações para gerar cor e sabor. No entanto, sob condições de baixa umidade, os compostos N-glicosil se reorganizam principalmente através da base de Schiff (STADLER; STUDER, 2015), sendo sua descarboxilação o fator limitante para a formação de acrilamida.

A base de Schiff descarboxilada reorganiza-se por tautomerização para formar o composto de Amadori descarboxilado, o qual forma acrilamida por β -eliminação. Por outro lado, a base de Schiff descarboxilada pode se decompor diretamente a 3-aminopropionamida (3-APA) que desamina facilmente para formar

acrilamida, ou em uma rota alternativa direta de 1,2-eliminação, que também pode levar à formação de acrilamida (GÖKMEN, 2016; STADLER; STUDER, 2015).

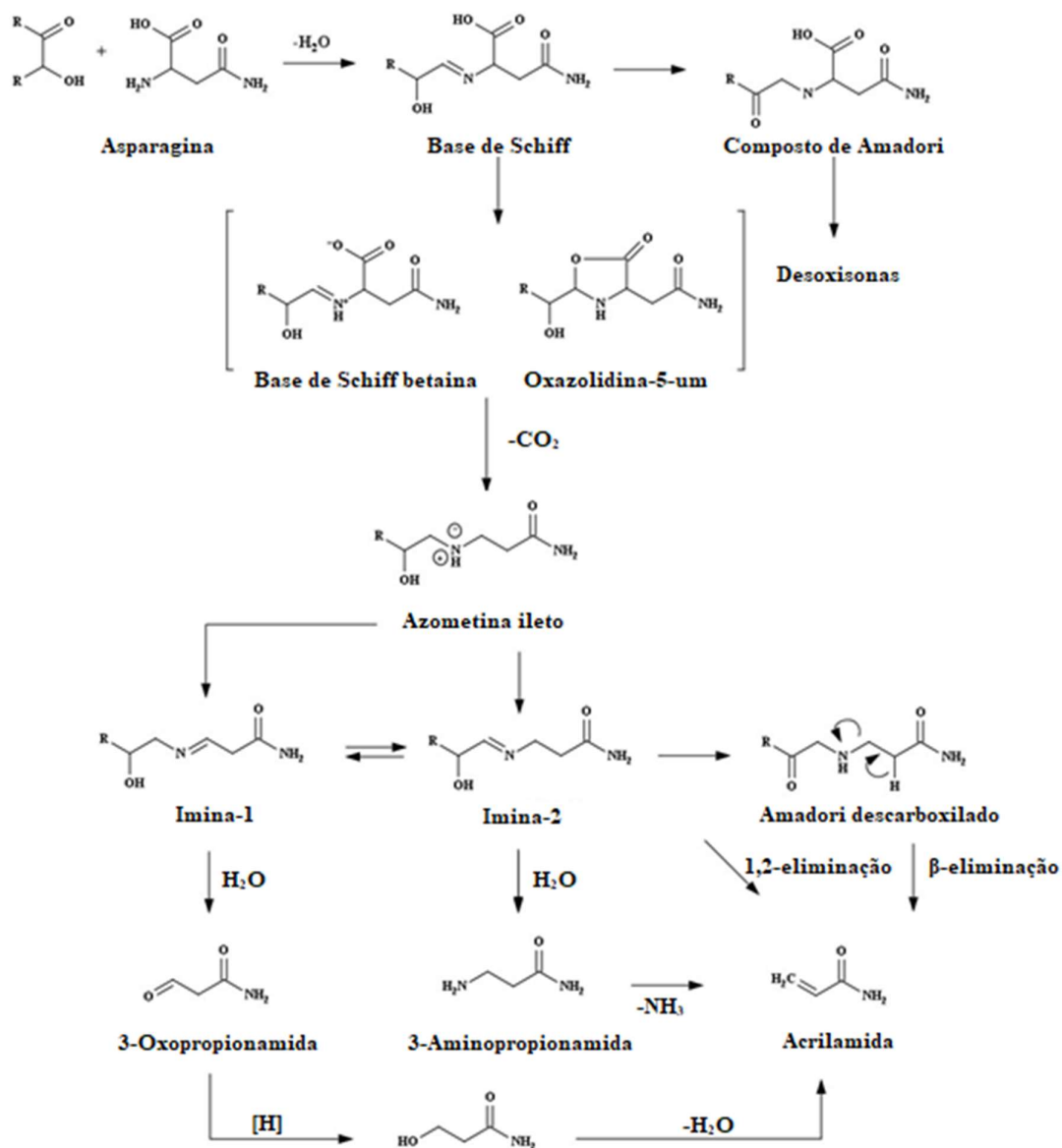


Figura 5. Mecanismo proposto da reação de Maillard para a formação de acrilamida a partir de asparagina e açúcar redutor. Fonte: STADLER; STUDER, 2015.

Como apresentado na Figura 6, várias rotas de formação de acrilamida sem o envolvimento da asparagina foram publicadas, mas em termos de importância para a contribuição global do contaminante podem ser consideradas marginais (STADLER; STUDER, 2015). A acroleína (2-propenal), por exemplo, é uma molécula candidata. Este aldeído de três carbonos pode ser formado por diferentes vias, incluindo degradação oxidativa de lipídios, degradação de carboidratos, aminoácidos e proteínas, e através da reação de Maillard, e quando oxidada pode fornecer ácido acrílico, que pode reagir com amônia via aminodesidroxilação para produzir acrilamida (STADLER; SCHOLZ, 2004). Este é provavelmente o fator limitante da reação, já que a amônia é volátil e não está prontamente disponível. A acroleína também pode reagir com asparagina e, sob certas condições, levar a quantidades significativas de acrilamida. O ácido acrílico também pode ser liberado diretamente da α -alanina ou β -alanina via desaminação termolítica (STADLER; STUDER, 2015).

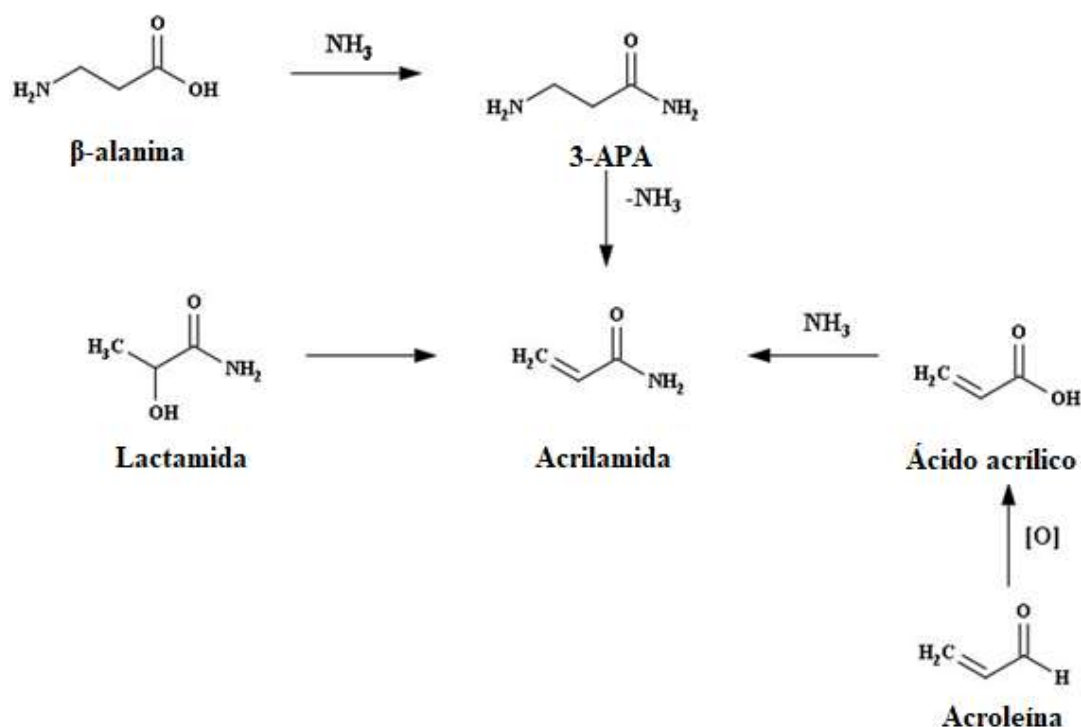


Figura 6. Rotas alternativas de formação de acrilamida. Fonte: STADLER; STUDER, 2015.

Granvogl et al. (2004) propuseram uma via alternativa à 3-APA que evita a exigência de um carboidrato ou carbonila, isto é, uma via não-Maillard. Os autores propõem que a 3-APA pode ser gerada diretamente através da descarboxilação da asparagina, uma via plausível na presença de uma enzima adequada que aceita a asparagina como substrato e o fosfato de piridoxal como cofator. Em particular, a histidina descarboxilase foi eficaz na liberação de 3-APA, embora a uma baixa taxa de conversão de cerca de 0,1%. A via enzimática 3-APA pode explicar a formação de acrilamida sob condições aquosas; por exemplo, a formação de acrilamida em concentrados de ameixa seca aquecida durante um período de tempo mais longo e sujeita à secagem a temperatura relativamente baixa ($< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.1.3. Aspectos toxicológicos e riscos à saúde

4.1.3.1. Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

Tanto em animais experimentais como em seres humanos, a acrilamida é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal após administração oral e amplamente distribuída nos tecidos, sem evidência de qualquer acúmulo, sendo capaz de atravessar a placenta e ser transferida em pequena quantidade para o leite (EFSA, 2015).

Foi estabelecido que a acrilamida pode ser metabolizada através de duas vias principais, como mostrado na Figura 7. A primeira via é o metabolismo da fase I mediada pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1), pelo qual é formada a glicidamida (GA) que posteriormente pode reagir com o DNA para formar adutos de DNA (EFSA, 2015; LI et al., 2016). A segunda via é a conjugação direta com glutathione (GSH). A acrilamida e a glicidamida são capazes de conjugar-se com GSH para formar conjugados de GSH através da catálise da enzima metabólica da fase II glutathione S-transferase (GST). Além disso, a degradação de conjugados de acrilamida-GSH e conjugados de GA-GSH resulta na formação de seus respectivos metabólitos de ácido mercaptúrico (MA) (LI et al., 2016).

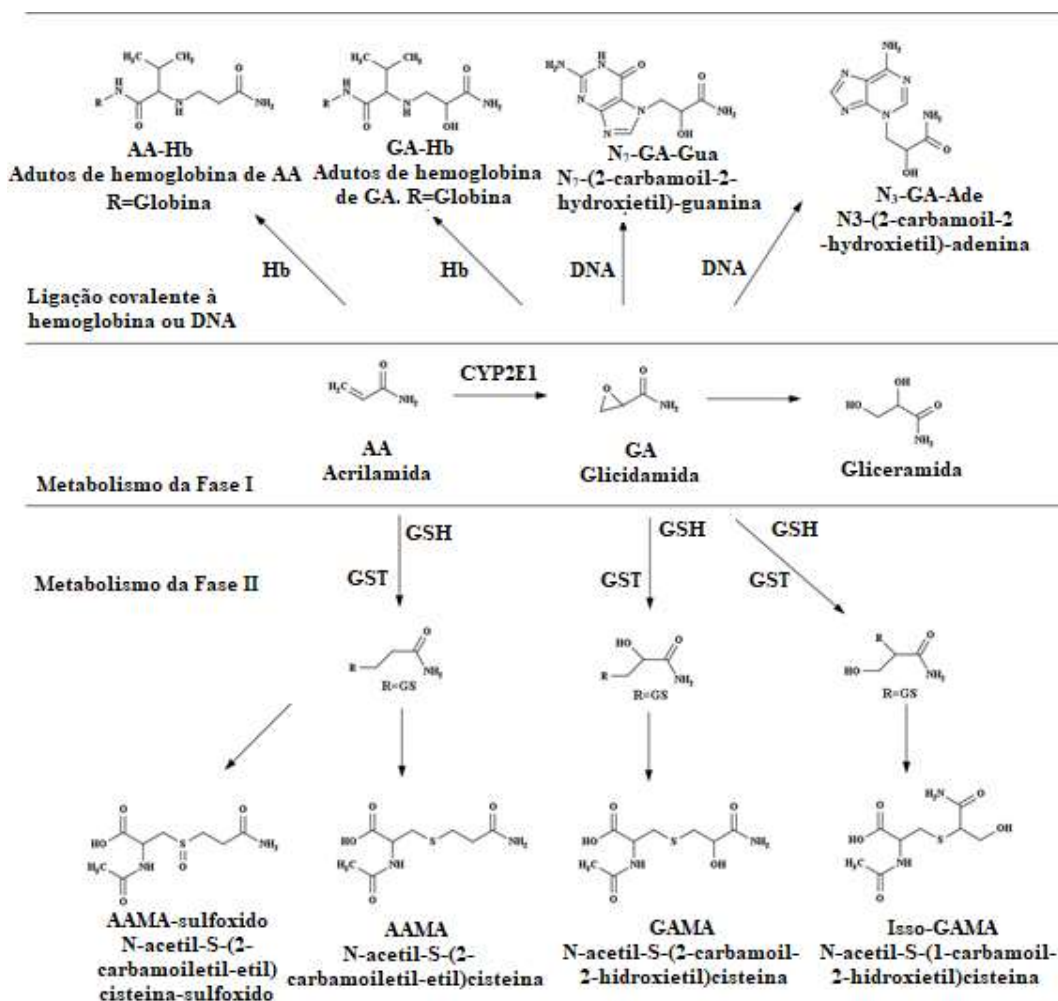


Figura 7. Esquema proposto das principais vias metabólicas da acrilamida. Fonte: LI et al., 2016.

Foi demonstrado que os adutos GA-DNA são responsáveis pela genotoxicidade e carcinogenicidade da acrilamida em ratos e camundongos (GALEŠA et al., 2008; KOYAMA et al., 2011; MAVRI, 2013; PAULSSON et al., 2003). A glicidamida tem sido conhecida por ser mais genotóxica e mutagênica do que seu precursor acrilamida (EFSA, 2015).

Acrilamida e glicidamida também são capazes de se ligar à proteína plasmática (KOLŠEK; SOLLNER DOLENC; MAVRI, 2013) e podem reagir com os resíduos de valina N-terminal da hemoglobina (Hb) para formar adutos (BERGMARK et al., 1993), que são amplamente utilizados como biomarcadores para exposição à acrilamida (FENG; LU, 2011).

A biodisponibilidade absoluta da acrilamida varia entre 23 e 48% em roedores para uma dose de 0,1 mg/kg de peso corpóreo (pc), e tanto a acrilamida quanto a glicidamida são rapidamente eliminadas na urina, com pequenas quantidades eliminadas pelas fezes e no CO₂ exalado (EC, 2002).

4.1.3.2. Carcinogenicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade

Uma quantidade considerável de estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* em ratos, camundongos, macacos, gatos e cães, utilizando vários protocolos de dosagem e vias de exposição indicaram que a acrilamida e seus metabólitos produzem efeitos neurotóxicos, refletidos pela paralisia dos membros posteriores, redução no desempenho do *rotarod* e/ou alterações histopatológicas nos nervos periféricos e estruturas do Sistema Nervoso Central, assim como toxicidade na reprodução, particularmente contagens reduzidas de espermatozoides e efeitos na morfologia dos espermatozoides e testículos. Toxicidade no desenvolvimento também foi relatada em níveis de exposição que, em alguns casos, também estão associados à toxicidade materna (EFSA, 2015; JECFA, 2011).

Além disso, estudos de genotoxicidade *in vitro* indicam que a acrilamida é um mutagênico fraco em células de mamíferos, mas um clastogênico efetivo, e o seu metabólito glicidamida é um forte mutagênico e clastogênico que induz mutações através de um mecanismo de formação de adutos de DNA. Em estudos *in vivo*, a acrilamida é claramente genotóxica em células somáticas e germinativas (EFSA, 2015; JECFA, 2011). A acrilamida exerce sua mutagenicidade via metabolismo pelo CYP2E1 para o epóxido glicidamida e também pode induzir mutações gênicas por uma via que envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e danos oxidativos ao DNA (EFSA, 2015).

A acrilamida também apresenta efeitos carcinogênicos amplamente documentados em ratos e camundongos de ambos os sexos, que atraíram a atenção mundial desde 1994, quando a IARC classificou este composto como provavelmente carcinogênico para humanos (grupo 2A) (IARC, 1994). Até o momento, vários estudos demonstraram que a administração oral de acrilamida em camundongos B6C3F₁ e ratos F344/N leva à carcinogenicidade de múltiplos órgãos (BELAND et al., 2015; EFSA,

2015). No entanto, a literatura existente carece de evidência epidemiológica confiável e inequívoca sobre a associação entre a ingestão dietética de acrilamida e o risco de câncer (ESPOSITO et al., 2017; VIRK-BAKER et al., 2014).

Estudos recentes mostram que a acrilamida além de apresentar características de carcinogenicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade, apresenta potencial de desregulação endócrina (EDC) em doses menores, alterando o equilíbrio hormonal fisiológico, sem sinais clínicos de toxicidade. Os EDCs interferem no metabolismo, crescimento e reprodução em diferentes períodos da vida, especialmente nos estágios embrionários e pubertários, nos quais a reprogramação de genes pode estar associada a comprometimento do desenvolvimento e controle dos tecidos ou órgãos mesmo na idade adulta (MATOSO et al., 2019).

4.1.3.3. Exposição humana e avaliação do risco

Após a descoberta de altos níveis de acrilamida em uma variedade de alimentos, muitos estudos foram conduzidos para estimar a exposição alimentar da população a este contaminante. Duas avaliações foram feitas pelo JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) em 2005 e 2011 e uma avaliação foi feita pela EFSA (*European Food Safety Authority*) em 2015. Na América Latina, avaliações sobre exposição alimentar à acrilamida só foram realizadas no Brasil (ARISSETO; TOLEDO, 2008) e na Colômbia (BARÓN, 2016), mas o Brasil não considerou o consumo de açúcares neste estudo preliminar. Dos países que incluíram diferentes tipos de açúcares em suas avaliações (GAO et al., 2016; KAWAHARA et al., 2018; BARÓN, 2016), o ANC foi um dos produtos que mais contribuiu para a exposição à acrilamida na média da população da cidade de Bogotá, na Colômbia.

Todas as avaliações concluem que a acrilamida e o seu metabólito glicidamida são genotóxicos e cancerígenos, e qualquer nível de exposição pode potencialmente danificar o DNA e levar ao câncer, impedindo o estabelecimento de uma ingestão diária tolerável (IDT) deste contaminante em alimentos. Em vez disso, os comitês empregaram o conceito de margem de exposição (MOE) como uma abordagem de caracterização do risco (EFSA, 2015). Tais estimativas de MOE são baseadas na razão

entre a $BMDL_{10}$ (dose de uma substância que produz um risco de saúde claro e de baixo nível, geralmente na faixa de uma mudança de 1-10% em um efeito tóxico específico, como a indução do câncer) e a exposição humana estimada (LINEBACK; COUGHLIN; STADLER, 2012).

A EFSA (2015) estimou o valor de $BMDL_{10}$ de 0,43 mg/kg p.c. por dia para efeitos não neoplásicos, especialmente a neurotoxicidade, derivado da incidência de degeneração axonal do nervo periférico (ciático) observada em ratos F344 machos expostos à acrilamida na água de beber por 2 anos. Normalmente, para compostos não genotóxicos, a menos que haja grandes lacunas no banco de dados toxicológico, um MOE de 100 é considerado suficiente para concluir que não há nenhum problema de saúde, e baseado nessa informação, o painel CONTAM (EFSA, 2015) estabeleceu uma MOE ajustada de 125 empregando estudos de modelagem de PBPK em ratos machos, ou seja que MOEs acima do valor ajustado de 125 indicam que não há nenhum problema de saúde para a neurotoxicidade. Já para efeitos neoplásicos a EFSA (2015) usou como ponto de referência o $BMDL_{10}$ de 0,17 mg/kg p.c. por dia, derivado como o menor $BMDL_{10}$ de dados sobre incidências de adenomas de glândula Harderiana e adenocarcinomas em camundongos B6C3F1 machos expostos à acrilamida por dois anos.

Para substâncias que são genotóxicas e carcinogênicas, uma MOE de 10000 ou superior representaria pouca preocupação do ponto de vista da saúde pública, mas como as MOEs calculadas em todas as avaliações da acrilamida são substancialmente inferiores a 10000 (Tabela 8), conclui-se que a exposição a esta substância representa preocupação com relação aos efeitos neoplásicos e deve ser minimizada (EFSA, 2015; JECFA, 2011).

Tabela 8. Resultados resumidos da caracterização do risco para acrilamida em alimentos.

Efeitos	NOAEL/BMDL ₁₀ (mg/kg p.c. por dia)	Estimativa de exposição (µg/kg p.c. por dia)	MOE	Referência
Alterações morfológicas nos nervos	0,2 (NOEL)	Média: 1 Alta: 4	200 50	JECFA (2005)
Efeitos reprodutivos e de desenvolvimento e outras lesões não neoplásicas	2,0 (NOEL)	Média: 1 Alta: 4	2000 500	
Câncer	0,3 (BMDL)	Média: 1 Alta: 4	300 75	
Alterações morfológicas nos nervos (ratos)	0,2 (NOAEL)	Média: 1 Alta: 4	200 50	
Tumores mamários (ratos)	0,31 (BMDL ₁₀)	Média: 1 Alta: 4	310 78	JECFA (2011)
Tumores na glândula harderiana (camundongos)	0,18 (BMDL ₁₀)	Média: 1 Alta: 4	180 45	
Efeitos neoplásicos (ratos)	0,17 (BMDL ₁₀)	(1)0,5 (LI)-1,9 (LS) (2)0,4 (LI)-0,9 (LS)	425 (LI)- 89 (LS)	EFSA (2015)
Neuropatia periférica (ratos)	0,43 (BMDL ₁₀)	(1)0,5 (LI)-1,9 (LS) (2)0,4 (LI)-0,9 (LS)	1075 (LI) - 226 (LS)	
Neurotóxicos	0,2 (NOEL)	Média: 0,14 Alta: 0,42	1429 476	ARISSETO ; TOLEDO (2008)
Efeitos na reprodução	2,0 (NOEL)	Média: 0,14 Alta: 0,42	14286 4762	
Carcinogênicos	0,3 (BMDL)	Média: 0,14 Alta: 0,42	2143 714	
Alterações morfológicas nos nervos	0,2 (NOEL)		628	
Tumores mamários (ratos)	0,31 (BMDL ₁₀)	Média: 0,319	973	GAO et al. (2016)
Tumores na glândula harderiana (camundongos)	0,18 (BMDL ₁₀)		565	
Efeitos neoplásicos (ratos)	0,17 (BMDL ₁₀)	Média: 0,52 Alta: 0,92	325 185	BARÓN (2016)
Neuropatia periférica (ratos)	0,43 (BMDL ₁₀)	Média: 0,52 Alta: 0,92	822 467	
Degeneração axonal no nervo ciático	0,43 (BMDL ₁₀)	Média: 0,14 Alta: 0,154	2792 1648	KAWAHARA et al. (2018)
Adenomas/adenocarcinomas na glândula harderiana	0,17 (BMDL ₁₀)	Média: 0,147 Alta: 0,154	1104 651	

BMDL₁₀: Dose que produziu uma resposta adversa baixa, mas mensurável em 1-10% da população; p.c.: Peso corpóreo; MOE: Margem de exposição; NOAEL: Nível sem efeito adverso observado; NOEL: Nível sem efeito observado; LI: Limite inferior mínimo; LS: limite superior máximo. (1) Bebês, crianças e outras crianças (2) Adolescentes, adultos, idosos e muito idosos.

4.1.4. Mitigação

Como a acrilamida provou ser carcinogênica em roedores e um provável carcinógeno humano, esforços significativos em escala global têm sido empreendidos para elaborar estratégias de redução nos principais alimentos de interesse, englobando produtos de batata, produtos à base de cereais (biscoitos, produtos de panificação, e cereais matinais) e café. A maioria dos métodos propostos para mitigar a formação de acrilamida busca remover seus precursores (glicose, frutose, asparagina) ou inibir ou reduzir a intensidade da reação de Maillard por diferentes modificações do processo (por exemplo, fritura a vácuo ou fritura convencional a baixas temperaturas), como mostrado na Figura 8 (PEDRESCHI; MARIOTTI, 2017).

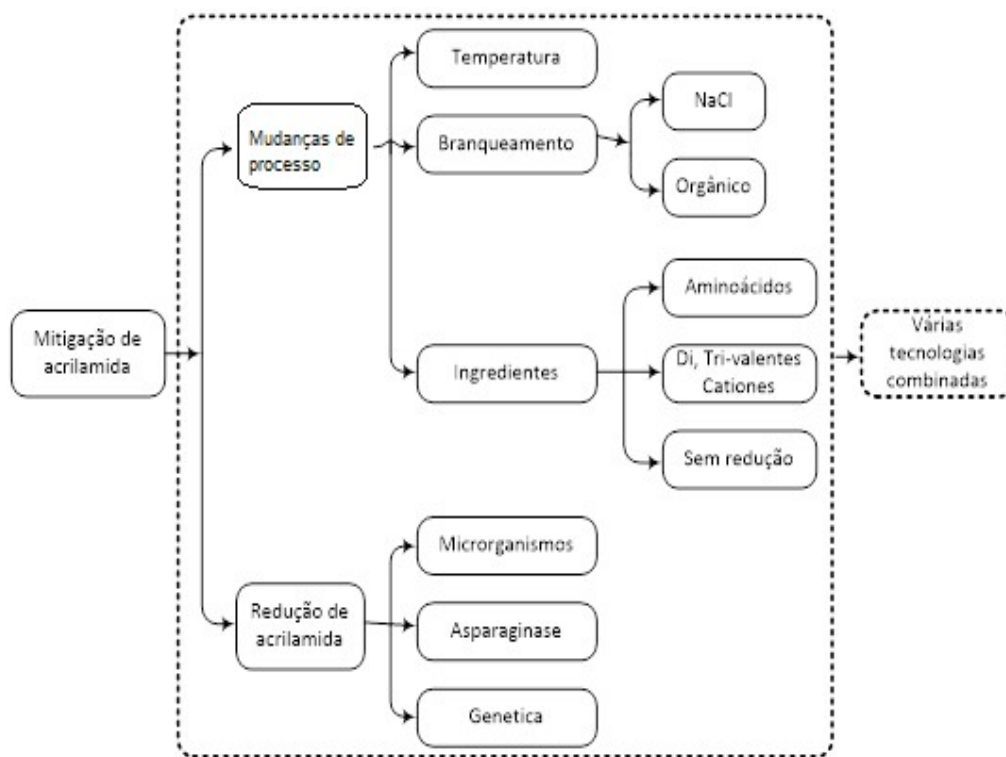


Figura 8. Técnicas de mitigação de acrilamida. Fonte: PEDRESCHI; MARIOTTI, 2017.

Nos últimos anos, as experiências da indústria de alimentos e dos cientistas que trabalham na mitigação de acrilamida foram reunidas em vários documentos de orientação como o Regulamento (UE) 2017/2158 da Comissão Europeia (EC, 2017), o CAC/RCP 67-2009 do Codex Alimentarius (CAC, 2009) e o Toolbox da Food Drink Europe (FDE, 2019). A Tabela 9 apresenta algumas estratégias de mitigação.

Tabela 9. Estratégias de mitigação da acrilamida em alimentos.

Alimento	Estratégia
Batata - Snacks à base de batata	<ul style="list-style-type: none"> - Seleção de variedades de batata com baixo teor de açúcar e asparagina. - Evitar armazenamento abaixo de 6°C. - Adição de asparaginase. - Otimizar tempo e temperatura do equipamento permitindo obter uma cor dourada no produto. - Adição de sais de cálcio. - Adição de ácido cítrico ou ascórbico. - Substituição parcial dos componentes da batata por ingredientes com menor teor de asparagina (por exemplo, trigo, arroz, milho). - Tratamentos de lavagem, branqueamento ou par-ebulição podem ser utilizados para lixiviar os precursores (asparagina / açúcar redutor) da superfície da batata antes da etapa de cozimento. - Tratamento das batatas fritas com ácido pirofosfato de sódio e cátions di- trivalentes. - Estabelecer instruções de cozimento específicas do produto na embalagem.
Produtos à base de cereais (ex. Pão, produtos de panificação, cereais matinais)	<ul style="list-style-type: none"> - Manter níveis de enxofre equilibrados no solo e assegurar uma correta aplicação de nitrogênio. - Utilizar a menor quantidade de farinha integral e / ou farelo quanto seja possível, sem afetar significativamente as propriedades organolépticas e nutricionais do produto. - Reduzir ou substituir o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) nas formulações. - Remoção de fontes de frutose ou substituição por glicose nos ingredientes do produto. - Adição de asparaginase. - Evitar o uso de açúcares redutores durante a fabricação de cereais matinais. - Avaliar o impacto dos ingredientes nos níveis de acrilamida no produto final. - Utilizar a combinação de tempo - temperatura que seja mais eficaz para reduzir a formação de acrilamida. - Para pré-misturas de produtos que precisam ser preparados em casa, deve-se fornecer instruções de preparação para garantir teores baixos de acrilamida.
Café e substitutos	<ul style="list-style-type: none"> - Produtos à base de grãos Robusta tendem a ter teores mais elevados de acrilamida do que os produtos à base de grãos Arábica. - Avaliação das condições de torrefação. - Adição de asparaginase. - Diminuir o teor de chicória (por exemplo, 3%) nas formulações de substitutos de café e substituição parcial (por exemplo, por cevada torrada, fibras de chicória).

Adaptado de: CAC, 2009; EC, 2017; FDE, 2019.

4.1.5. Aspectos regulatórios

Até o momento, o gerenciamento de risco de acrilamida em alimentos tem sido voluntário e colaborativo envolvendo agências regulatórias e empresas produtoras de alimentos. Nenhum país usou medidas regulatórias para estabelecer limites de acrilamida nos alimentos ou na dieta, sendo que a *European Commission* (EC) tem estabelecido no Regulamento (UE) 2017/2158 medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em 10 categorias de alimentos (Tabela 10), sem incluir os açúcares.

Tabela 10. Níveis de referência para a presença de acrilamida.

Gênero alimentício	Nível de referência [µg/kg]
Batatas fritas (prontas para consumo)	500
Batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas e com massa de batata	750
Bolachas salgadas à base de batata	
Outros produtos de batata à base de massa de batata	
Pão fresco	
a) Pão à base de trigo	50
b) Pão fresco excluindo pão à base de trigo	100
Cereais matinais	
- Produtos à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de <i>gun puffing</i>	300
- Produtos à base de trigo e centeio ⁽¹⁾	300
- Produtos à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz ⁽¹⁾	150
Biscoitos e <i>wafers</i>	350
Biscoitos salgados com exceção dos biscoitos à base de batata	400
Pão estaladiço (<i>knäckebrot</i>)	350
Ginger bread	800
Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	300
Cafê torrado	400
Cafê instantâneo (solúvel)	850
Substitutos do café	
a) Substitutos do café exclusivamente a partir de cereais	500
b) Substitutos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória	⁽²⁾
c) Substitutos do café obtidos exclusivamente a partir de chicória	4000
Alimentos para bebês, alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças, exceto bolachas e torradas ⁽³⁾	40
Bolachas e torradas para lactentes e crianças ⁽³⁾	150

⁽¹⁾ Cereais não integrais e/ou não à base de farelo. O cereal presente em maior quantidade determina a categoria. ⁽²⁾ O nível de referência a aplicar aos substitutos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória tem em conta a proporção relativa destes ingredientes no produto final. ⁽³⁾ Conforme definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013.

Fonte: EC (2017).

Estes valores não são limites regulatórios, mas destinam-se a indicar a necessidade de investigar as razões pelas quais os conteúdos de acrilamida em alimentos na categoria específica excedem o valor indicativo, tentando manter o nível de acrilamida tão baixo quanto razoavelmente possível. Embora o Regulamento (UE) 2017/2158 não apresente um nível de referência para o ANC, o limite sugerido pelos importadores europeus é de 500 µg/kg de acrilamida (SATÍN, 2018).

4.1.6. Determinação de acrilamida em alimentos

4.1.6.1. Propriedades químicas da acrilamida

A acrilamida é uma molécula com baixo peso molecular (71,08 g/mol), sendo que seu espectro de massas não é muito característico e os íons qualificadores têm intensidades muito baixas, o que representa um sério problema de quantificação em baixos níveis. Possui alta solubilidade em água, álcoois, acetona e acetonitrila, é ligeiramente solúvel em acetato de etila, diclorometano e éter dietílico, e insolúvel em hexano e outros alcanos e alquenos. A volatilidade da molécula é baixa, mas significativa (WEISSHAAR, 2004), não fluoresce e tampouco possui um cromóforo característico para a detecção UV (EL-ZINEY; AL-TURKI; TAWFIK, 2009).

4.1.6.2. Métodos analíticos

Desde a descoberta da acrilamida em alimentos em 2002, uma infinidade de diferentes métodos analíticos foram publicados e a seleção da metodologia apropriada é baseada principalmente no tipo de produto alimentício (matriz de amostra), estrutura e propriedades da acrilamida (ORACZ; NEBESNY; ZYZELEWICZ, 2011).

Técnicas como cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas com armadilha de íons (GC-IT/MS) (RUSSO et al., 2014), cromatografia gasosa com detecção de ionização por chama (GC-FID) (GHIASVAND; HAJIPOUR, 2016), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV (ALBISHRI; EL-HADY, 2014), cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (BACKE; YINGLING; JOHNSON, 2014), cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a detector por arranjo de diodos (RP-HPLC/DAD) (MICHALAK; GUJSKA; KUNCEWICZ, 2013), eletroforese capilar (CE)

(CHEN; ZHAO; FUNG, 2011), biossensores (PUNDIR; TADAV; CHHILLAR; 2019) e espectrofotometria UV-Vis (ALTUNAY; ELIK; GÜRKAN, 2018) tem sido reportadas, mas os métodos mais comumente utilizados são cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com e sem derivatização (GC-MS) (PAN et al., 2020).

Devido à alta polaridade, baixa volatilidade e baixo peso molecular da acrilamida, o processo de derivatização é frequentemente necessário para aumentar a estabilidade da acrilamida e melhorar ainda mais a sensibilidade de detecção do GC e sua tecnologia de combinação. LC-MS/MS, no entanto, não necessita de derivatização do analito, reduzindo muito o tempo de análise e atendendo aos requisitos para um ambiente verde (PAN et al., 2020).

As principais etapas da análise de acrilamida em alimentos são mostradas na Figura 9.

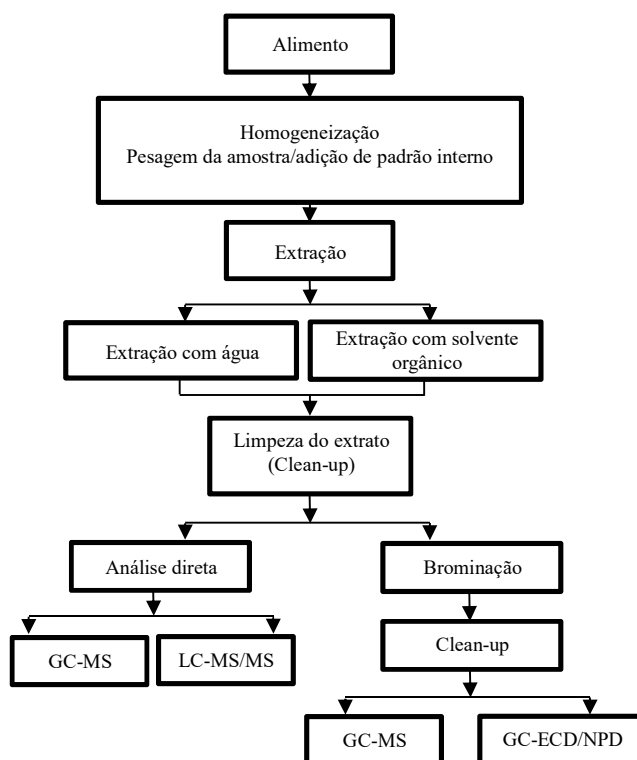


Figura 9. Esquema geral para a análise da acrilamida. Fonte: CASTLE; ERIKSSON, 2005.

4.1.6.2.1. Amostragem e homogeneização. A acrilamida não é distribuída de forma homogênea na maioria dos alimentos, mas concentra-se na superfície. Assim, o passo inicial durante a análise da acrilamida é obter uma amostra homogênea e representativa (CASTLE; ERIKSSON, 2005). A completa homogeneização é geralmente conseguida por meio da moagem da amostra sólida usando um moedor de laboratório ou processador de alimentos (GÖKMEN, 2016). A acrilamida é solúvel em água e praticamente insolúvel nas fases oleosa e gordurosa; portanto, se houver alguma tendência para os alimentos se separarem, isso deve ser evitado (EL-ZINEY; AL-TURKI; TAWFIK, 2009).

A adição de padrão interno antes da extração é bastante relatada na literatura. Seu uso melhora significativamente a precisão e exatidão das medições e compensa potenciais desvios das transferências volumétricas e a variabilidade do sinal dos sistemas cromatográficos causada por efeitos de matriz e/ou imprecisões no volume de injeção. Adicionar acrilamida isotopicamente marcada no início do tratamento da amostra é uma maneira de levar em consideração as perdas do analito que podem ocorrer durante todo o processo de extração (CASTLE; ERIKSSON, 2005).

Os padrões internos amplamente utilizados para a determinação de acrilamida incluem padrões internos marcados com isótopo, tais como padrões internos marcados com deutério ($^2\text{H}_3$ -acrilamida ou d_3 -acrilamida) e marcados com carbono ($^{13}\text{C}^3$ -acrilamida) e não marcados com isótopos, como metacrilamida, N,N-dimetilacrilamida e acetamida. Os padrões internos marcados como isótopos são ideais para uso em análises baseadas em espectrometria de massas (GÖKMEN, 2016).

4.1.6.2.2. Extração e clean-up. Diferentes procedimentos têm sido reportados para a extração de acrilamida a partir de amostras de alimentos, sendo que, até o momento, não há métodos oficiais publicados. A quantificação da acrilamida requer o isolamento completo deste analito, além da purificação de substâncias co-extraíveis que podem interferir na análise. O solvente mais comumente usado para a extração da acrilamida é a água, sendo que misturas de diluentes orgânicos polares têm sido relatadas com menor frequência (ORACZ; NEBESNY; ZYZELEWICZ, 2011).

A limpeza do extrato depende do método de detecção que é usado. Para os métodos que usam LC-MS/MS, a limpeza usualmente consiste em extração em fase sólida (SPE) sequencial utilizando várias combinações de cartuchos. A combinação mais

frequentemente utilizada é de cartuchos Oasis HLB® e Bond Elut Accucat® (KRSKA et al., 2012).

Por outro lado, a microextração em fase sólida (SPME) é um tipo de método de extração seletiva que não utiliza solvente nem empacotamento em coluna como SPE, e que seu princípio operacional se baseia na sorção das espécies de interesse por um filme de material sorvente depositado sobre uma fibra de sílica fundida. Portanto, o SPME possui as características de baixo custo, dispositivo e operação simples, rápido, eficiente e de alta sensibilidade. As fases sorventes de fibras de SPME comerciais consistem em materiais poliméricos puros como polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) ou blendas poliméricas imobilizadas no substrato de sílica fundida como PDMS-divinilbenzeno (PDMS/DVB), Carboxen-PDMS e outros (PIVATO, 2008). Como um método único de pré-tratamento e fortificação de amostra, o SPME também recebeu atenção na detecção de acrilamida (PAN et al., 2020; POURMAND; GHAEMI; ALIZEDH, 2017; NEMATOLLAHI et al., 2019; WAWRZYNIAK; JASIEWICZ, 2019).

A versão mais recente da técnica de SPE clássica é a extração em fase sólida dispersiva (dSPE), na qual se baseia o método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) proposto por Anastassiades et al. (2003). O método ganhou grande popularidade devido a seus benefícios na redução de solventes, custos, tempo de resposta e eficiência de extração. Quimicamente, é uma forma de extração dispersa em fase sólida e protocolo de limpeza que fornece excelentes recuperações e remoção adequada de interferentes (STEFANOVIC; ĐORDEVIC; JELUSIC, 2017).

Mastovska e Lehotay (2006) desenvolveram e otimizaram um procedimento de preparo de amostra baseado no método QuEChERS para análise de acrilamida em várias matrizes alimentares empregando água, que facilita a extração de acrilamida, hexano, que serve para remover a gordura da amostra, e acetonitrila como solvente de extração que fornece, devido à sua imiscibilidade com hexano, uma opção simples de limpeza para remoção de co-extrativos menos polares da matriz lipofílica. Também emprega MgSO₄ e NaCl, uma combinação de sais que induzem a separação das camadas de água e acetonitrila e força a acrilamida para a fase orgânica. Depois, uma alíquota do extrato de acetonitrila é limpa por extração em fase sólida dispersiva usando adsorvente de amina secundária primária (PSA), que retém compostos contendo grupos carboxílicos, sendo eficaz em diminuir o efeito de supressão da matriz e principalmente na remoção do

componente interferente da matriz na análise de LC-MS/MS e MgSO_4 , que remove a água residual do extrato.

O QuEChERS tem sido empregado como método de preparo de amostras para a determinação de acrilamida em diferentes tipos de alimentos como mostrado na Tabela 11, mas seu uso ainda não foi reportado para análise do contaminante em ANC.

Tabela 11. Determinação de acrilamida em diferentes matrizes empregando o método de preparo de amostra QuEChERS.

Matriz	Técnica analítica	Referência
Pão e produtos de panificação	LC-MS/MS	ANDAČIĆ et al. (2020)
Casca de cacau	LC-MS/MS	BARIŠIĆ et al. (2020)
Bebidas, grãos e confeitos	SFC/MS/MS	YOSHIOKA et al. (2019)
Pão, biscoitos, bolachas, bolos	GC-MS	NEMATOLLAHI et al. (2019)
<i>Keribo</i>	HPLC-DAD	DIBABA et al. (2018)
Café e substitutos de café	GC-MS	SURMA et al. (2017)
Frutas secas (ameixas e passas) e algumas sementes comestíveis	LC-MS/MS	DE PAOLA et al. (2017)
Alimentos infantis	LC-MS/MS	PETRARCA et al. (2017)

SFC: Cromatografia de fluido supercrítico; DAD: Detector de arranjo de diodos.

4.1.6.2.3. Análise cromatográfica. Até o momento pode-se concluir que a técnica de LC-MS/MS é a mais utilizada para determinação da acrilamida devido à sua alta reprodutibilidade, seletividade e sensibilidade, além de requerer menor tempo de análise e, em termos gerais, protocolos "mais simples" do que os métodos de derivatização para análise por GC-MS. A acrilamida tem uma baixa massa molecular e, assim, a molécula protonada produzida por ionização é propensa à interferência de íons da mesma massa ou de uma massa semelhante, resultantes da fragmentação dos muitos compostos de massa superior. Para melhorar a confiabilidade na identificação, a espectrometria de massas sequencial produz fragmentos da molécula protonada em proporções constantes sob as mesmas condições (GÖKMEN, 2016).

Em LC-MS/MS, a molécula protonada de acrilamida em m/z 72 $[\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2]^+$ é fragmentada por colisão com um gás adequado, como argônio, para dar origem a íons produto com m/z 55 $[\text{CH}_2=\text{CHCNH}]^+$ resultando da perda de NH_3 e m/z 54 $[\text{C}_3\text{H}_4\text{N}]^+$. A transição de m/z 72 para 55 é a mais abundante e apresenta intensidade

relativamente alta, portanto, é usada invariavelmente para fornecer o sinal para quantificação. A evidência de suporte de identidade de pico (transição de confirmação) é obtida monitorando-se a transição $72 > 54$, $72 > 44$ ou $72 > 27$ $[\text{C}_2\text{H}_3]^+$ (GÖKMEN, 2016). A transição $72 > 72$ também foi observada com uma intensidade relativa de aproximadamente 195% em comparação com $72 > 55$ (ROSÉN; HELLENÄS, 2002). Para a detecção da acrilamida marcada isotopicamente usada como padrão interno, as transições monitoradas são $75 > 58$ para $[\text{D}_3]$ - e $[\text{C}_3]$ -acrilamida e $73 > 56$ para $[\text{C}_1]$ -acrilamida.

A separação da acrilamida nas colunas de cromatografia líquida é um desafio adicional. A coluna C18 ou ODS é frequentemente usada, mas o comportamento de retenção pode diferir dependendo do seu *endcapping*. Nesse contexto, um *endcapping* hidrofílico aparentemente favorece a retenção de acrilamida ao usar um sistema de eluição aquoso. As colunas de carbono em grafite (Hypercarb) também foram empregadas com sucesso para a determinação da acrilamida, apesar de alguns analistas terem notado que isso pode levar a respostas instáveis em um lote analítico. O uso de uma coluna de gel de polimetacrilato também foi relatado bem como uma coluna de fase normal. No caso posterior, um sistema de eluição ácida (H_2SO_4 0,01 M) foi combinado com a detecção por UV (STADLER; GOLDMANN, 2008).

5. Conclusão

A presença de acrilamida em alimentos processados termicamente tem se convertido em uma questão de interesse para a saúde pública devido à sua ocorrência em alimentos de consumo comum e os seus efeitos neurotóxicos e potencialmente carcinogênicos e genotóxicos em humanos. Existem poucos estudos sobre os níveis de acrilamida em açúcares e os dados existentes até o momento são basicamente provenientes de países como Colômbia, Peru, China e Japão, fazendo-se necessário obter maiores informações que permitam o desenvolvimento de estratégias de mitigação para este produto. Além disso, não existem dados de avaliação da exposição da população brasileira à acrilamida através do consumo de açúcar não centrifugado, alimento amplamente produzido e comercializado nos estados do Nordeste.

6. Referências Bibliográficas

- ALAVÉS, M. (2010). Method for obtaining with sugar from cane juice. Depositante: Alavés Bolaños, Mario. W O 2010/131937 A I. Depósito: 11 jan. 2010. Concessão: 18 nov. 2010.
- ALBISHRI, H.; EL-HADY, D. (2014). Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta*, v. 118, p. 129–136.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. (2018). Extraction and reliable determination of acrylamide from thermally processed foods using ionic liquid-based ultrasound-assisted selective microextraction combined with spectrophotometry. *Food Additives and Contaminants - Part A*, v. 35, n. 2, p. 222–232.
- ANASTASSIADES; M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D; SCHENCK, F. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. v. 86, p. 412-431.
- ANDAČIĆ, I. et al. (2020). Exposure of the Croatian adult population to acrylamide through bread and bakery products, *Food Chemistry*, v. 322, 126771, p. 1-8.
- ARISSETO, A. et al. (2007). Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 24, n. 3, p. 236–241.
- ARISSETO, A.; TOLEDO, M. C. (2006). Acrilamida em Alimentos : Uma Revisão. Acrylamide in Foods : A Review. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 2, p. 123–134.
- ARISSETO, A.; TOLEDO, M. C. (2008). Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 21, n. 1, p. 9–14.
- ASIKIN, Y. et al. (2016). Effects of different drying–solidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of non-centrifugal cane brown sugar. *LWT - Food Science and Technology*, v. 66, p. 340-347.
- BACKE, W.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. (2014). The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection - hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1334, p. 72-78.
- BARIŠIĆ, V. et al. (2020). 5-Hydroxymethylfurfural and acrylamide content of cocoa shell treated with high voltage electrical discharge. *Food Control*, v. 110, 107043, p.

- 1-9.
- BARÓN, W. (2016). Acrilamida – Estudio de Consumo en Alimentos Bogotanos. Dissertação (Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- BELAND, F. et al. (2015). Carcinogenicity of glycidamide in B6C3F1 mice and F344/N rats from a two-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*, v. 86, p. 104–115.
- BERGMARK, E. et al. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 130, p. 45–54.
- CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2009). CAC/RCP 67-2009. Code of practice for the reduction of acrylamide in foods.
- CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2019). CL 2019/34-CS. Proyecto de norma para el jugo de caña de azúcar deshidratado no centrifugado. Roma.
- CASTLE, L.; ERIKSSON, S. (2005). Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 1, p. 274–84.
- CHEN, Q.; ZHAO, W.; FUNG, Y. (2011). Determination of acrylamide in potato crisps by capillary electrophoresis with quantum dot-mediated LIF detection. *Electrophoresis*, v. 32, n. 10, p. 1252-1257.
- CHENG, W. et al. (2009). Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 17, n. 3, p. 190–197.
- CIMPA. (1992). Manual de elaboración de panela y otros derivados de la caña. Disponible em: https://www.researchgate.net/publication/306375615_MANUAL_DE_ELABORACION_DE_PANELA_Y_OTROS_DERIVADOS_DE_LA_CANA>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- COLINA, J. et al. (2012). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bebidas elaboradas con panela. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 62, n. 3, p. 303–310.
- CORPOICA. (2004). Composición de panela en bloque de acuerdo con muestras tomadas en diferentes regiones del país. Análisis realizados en laboratorios de CORPOICA-CIMPA entre 1988 y 2004. Centro de investigación Tibaitata.
- DE PAOLA et al. (2017). Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection. *Food Chemistry*,

- v. 217, p. 191-195.
- DEZFULY, M.; MAHADEVIAIAH; DEMAPPA, T. (2013). Effective of Different Flocculants on Fresh and Stale Sugarcane Juice Clarification. *Research Journal of Recent Sciences*. v. 2, n. 7, p. 48-52.
- DIBABA et al. (2018). Acrylamide occurrence in *Keribo*: Ethiopian traditional fermented beverage. *Food Control*, v. 86, p. 77-82.
- DINERO (2014). El negocio de la panela crece y se derrite a la vez. Disponível em: <<https://www.dinero.com/empresas/articulo/balance-del-sector-panelero-colombia-2014/202561>>. Acesso em: 8 jul. 2019.
- EC. EUROPEAN COMMISSION. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_acrylamide_out131_en.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- EC. EUROPEAN COMMISSION. (2017). Commission Regulation (EU) 2017/2158. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*. v. 13, n. 6, p. 1-321.
- ELIAS, A. et al. (2017). Acrylamide in commercial foods and intake by infants in Estonia. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 34, n. 11, p. 1875–1884.
- EL-ZINEY, M.; AL-TURKI, A.; TAWFIK, M. (2009). Acrylamide status in selected traditional Saudi foods and infant milk and foods with estimation of daily exposure. *American Journal of Food Technology*, v. 4, n. 5, p. 177–91.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (s.d.). Rapadura. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fjighhp202wyiv80sq98yqyvgmia8.html>>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (2014). CPP Fabricação de Açúcar Mascavo, Melado e Rapadura. 1ª edição. Para Centrais Elétricas Brasileiras S.A- Eletrobras. Rio de Janeiro.
- ESPOSITO, F. et al. (2017). Determination of acrylamide levels in potato crisps and other snacks and exposure risk assessment through a Margin of Exposure approach. *Food and Chemical Toxicology. Part A*, v. 108, p. 249–256.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (1994). Sugar crops and

- sweeteners and derived products. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/faodef/fdef03e.HTM>>. Acesso em: 8 jul. 2020.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (2014). Procesados de productos diversos. Fichas técnicas. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au171s.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FAOSTAT. (2017). New Foods Balances. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FDE. FOOD DRINK EUROPE. (2019). Acrylamide Toolbox. Disponível em: <https://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FENG, C.; LU, C. (2011). Modification of major plasma proteins by acrylamide and glycidamide: Preliminary screening by nano liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 684, n. 1–2, p. 89–95.
- GALEŠA, K. et al. (2008). Carcinogenicity of acrylamide: A computational study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 8720–8727.
- GAO, J. et al. (2016). Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 87, p. 97–102.
- GHIASVAND, A.; HAJIPOUR, S. (2016). Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection. *Talanta*, v. 146, p. 417–422.
- GÖKMEN, V. (2016). Chapter 5. Acrylamide Formation in Foods: Role of Composition and Processing. Em: *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. Springer. 1 ed. p. 67–80.
- GÓMEZ-NARVÁEZ, F. et al. (2019). Occurrence of acrylamide and other heat-induced compounds in panela: Relationship with physicochemical and antioxidant parameters. *Food Chemistry*, v. 301, p. 1–9.
- GRANVOGL, M. et al. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – A minor but potent precursor in acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 15, p. 4751–4757.
- HARISH NAYAKA, M. et al. (2009). Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. *Food Chemistry*, v. 115, n. 1, p. 113–118.
- IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (1994). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Acrylamide. *IARC Monographs*, v. 60, p. 389–433.

- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (2011). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Consumo alimentar domiciliar per capita.
- ICBF. INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. (2020). Encuesta nacional de la situación nutricional ENSIN 2015. Disponível em: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/libro-ensin-2015.pdf>/ Acesso em: 20 Agosto 2020.
- INS. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2012). Concepto científico acrilamida en panela. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia. Disponível em: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Concepto-poliacrilamida-en-panela.pdf>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- INVIMA. INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS. (2018). Informe de resultados del plan nacional subsectorial de vigilancia y control de acrilamida en alimentos procesados durante los años 2015-2016. Gobierno de Colombia. Disponível em: <<https://www.invima.gov.co/documents/20143/440892/INFORME-ACRILAMIDA.pdf/7c18507c-d593-44c6-eb32-93be35fa8378?t=1560290190255>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- JAFFÉ, W. (2013). Non centrifugal sugar: world production and trade. Disponível em: <<http://www.panellamonitor.org/documents/558/non-centrifugal-sugar-world-production-and-trade/>>. Acesso em: 8 jul. 2020.
- JECFA. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. (2005). Safety evaluation of certain contaminants in food. Sixty-fourth meeting. World Health Organization.
- JECFA. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting. World Health Organization.
- KADAM, U. et al. (2008). Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 1154–1160.
- KAWAHARA, J. et al. (2018). Estimation of long-term dietary exposure to acrylamide of the Japanese people. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 35, n. 9, p. 1689–1702.
- KOLŠEK, K.; SOLLNER DOLENC, M.; MAVRI, J. (2013). Computational study of the reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with deoxyadenosine and glutathione. *Chemical*

- Research in Toxicology*, v. 26, p. 106–111.
- KOYAMA, N. et al. (2011). Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, n. 1, p. 11–19.
- KRSKA et al. (2012). Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 139–162.
- LARRAHONDO, J. (1995). Calidad de la Caña de Azúcar. Em: CENICAÑA (Ed.). El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Tercera ed.
- LI, D. et al. (2016). Metabolism of Acrylamide: Interindividual and Interspecies Differences as Well as the Application as Biomarkers. *Current Drug Metabolism*, v. 17, p. 317–326.
- LIMA, R. (2012). Processo de clarificação de caldo de cana-de-açúcar aplicando elétrons acelerados. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- LINEBACK, D.; COUGHLIN, J.; STADLER, R. (2012). Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 3, p. 15–35.
- LOIRET, F. et al. (2009). Inoculation of sugarcane with *Pantoea* sp. increases amino acid contents in shoot tissues; serine, alanine, glutamine and asparagine permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of the bacterium. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, n. 11, p. 1152–1161.
- LOPEZ, J.; OSORIO, G. (2004). Especies vegetales utilizadas como aglutinantes o floculantes em la agroindustria panelera. Plegable divulgativo 15. Rionegro, Colombia. Disponível em: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17179/41496_41457.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 26 dezembro 2020.
- MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. (2006). Rapid Sample Preparation Method for LC–MS/MS or GC–MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 19, p. 7001–7008.
- MATOSO, V. et al. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, v. 283, p. 422–430.

- MAVRI, J. (2013). Can the chemical reactivity of an ultimate carcinogen be related to its carcinogenicity? An application to propylene oxide. *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 1, p. 479–485.
- MESIAS, M. et al. (2020). Formation of acrylamide and other heat-induced compounds during panela production. *Foods*, v.9, n.4: 531, p. 1-20.
- MESIAS, M. et al. (2019). Reassessment of acrylamide content in breakfast cereals. Evolution of the Spanish market from 2006 to 2018. *Food Control*, v. 105, p. 94–101.
- MICHALAK, J.; GUJSKA, E.; KUNCEWICZ, A. (2013). RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 32, n. 1, p. 68–73.
- MOJSKA, H. et al. (2010). Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2090–2096.
- MOSQUERA, S.; CARRERA, J.; VILLADA, H. (2007). Variables que afectan la calidad de la panela procesada en el Departamento del Cauca. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*. v. 5, n. 1, p. 17-27.
- MOTTRAM, D.; WEDZICHA, B.; DODSON, A. (2002). Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, v. 419, p. 448–449.
- MUJICA, M., GUERRA, M., SOTO, N. (2008). Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperatura de punteo sobre la calidad de la panela granulada. *Interciencia*, v. 33, n. 8, p. 598–603.
- NEMATOLLAHI et al. (2019). Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science*, v. 87, p. 157-164.
- NORMANDIN, L. et al. (2013). Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology*, v. 57, p. 75–83.
- OLIMPIO, J. (2014). Economia da rapadura. EMATER-PI. Disponível em: <<http://www.sinterpi.org.br/artigos/economia-da-rapadura/>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- ÖLMEZ, H. et al. (2008). A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 564–568.
- ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, v. 86, p. 23–34.
- ORTIZ et al. (2011). Extraction and drying of natural flocculants used in cane juice clarification. *Biotecnologia en el sector agropecuario y agroindustrial*, v. 9, n. 2, p.

- 32-40.
- OSORIO, G. (2007). Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas -BPA- y Buenas Prácticas de Manufactura -BPM-en la Producción de Caña y Panela. Primera ed. Edited by C. Print. Medellín. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a1525s.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- OU, X. et al. (2007). Determination of Acrylamide in Sugar by Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography. *Food and fermentation industries*, v. 33, n. 11, p. 118–120.
- PACETTI, D. et al. (2015). Acrylamide levels in selected Colombian foods. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, v. 8, n. 2, p. 99–105.
- PAES, J.; FERNANDES, A.; BARBOSA, C. (2003). Produção de açúcar mascavo, melado e rapadura. Livro: *Projetos de Empreendimentos Agroindustriais - Produtos de origem Vegetal*. Ed. 1, Capítulo 4. Editora UFV. DOI: 10.13140/RG.2.1.3198.5524.
- PAL, M. et al. (2018). HPLC-UV Quantitative Analysis of Acrylamide in Snack Foods of India. *Defence Life Science Journal*, v. 4, n. 1, p. 45–54.
- PAN, M. et al. (2020). Review of Research into the Determination of Acrylamide in Foods. *Foods*, v. 9, n. 4, 524, p. 1-20.
- PAULSSON, B. et al. (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 535, n. 1, p. 15–24.
- PAYET, B.; SING, A.; SMADJA, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 26, p. 10074–9.
- PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, M. (2017). Chapter 19. Mitigation of Acrylamide Formation in Highly Consumed Foods. In: *Global Food Security and Wellness*. 1 ed. Springer, p. 357–372.
- PETRARCA et al. (2017). Simultaneous determination of acrylamide and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone in baby food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1522, p. 62-69.
- PIVATO, A. (2008). Fibras para SPME (Microextração em fase sólida) recobertas com novos ormosils sol-gel. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de química. Departamento de química analítica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- POURMAND, E.; GHAEMI, E.; ALIZADEH, N. (2017). Determination of acrylamide

- in potato-based foods using headspace solid-phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled with ion mobility spectrometry: A heat treatment study. *Analytical Methods*, v. 9, p. 5127–5134.
- PUNDIR, C.; YADAV, N.; CHHILLAR, A. (2019). Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 85, p. 211–225.
- QUEZADA-MORENO, W.; GALLARDO-AGUILAR, I. (2014). Clarificación del jugo de caña mediante el empleo de plantas mucilaginosas. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, v. 48, n. 3, p. 41-48.
- RODRÍGUEZ, G. (2004). La agroindustria rural de la panela en Colombia: roles, problemática y nuevos retos. *Innovación y Cambio Tecnológico*. Disponible en: <<http://www.panellamonitor.org/documents/180/la-agroindustria-rural-de-la-panela-en-colombia-ro/>>. Acceso en: 13 jul. 2020.
- ROSÉN, J.; HELLENÄS, K. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, v. 127, n. 7, p. 880-882.
- ROZO, T. (2013). Manual técnico de buenas prácticas de manufactura (BPM) para el proceso tecnológico de producción de panela. Corhuila. Disponible en: [https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual Técnico BPM Trapiches.pdf](https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual_Técnico_BPM_Trapiches.pdf). Acceso en: 13 jul. 2020.
- RUSSO, M. et al. (2014). Rapid and simple determination of acrylamide in conventional cereal-based foods and potato chips through conversion to 3-[bis(trifluoroethanoyl)amino]-3-oxopropyl trifluoroacetate by gas chromatography coupled with electron capture and ion trap mass spect. *Food Chemistry*, v. 146, p. 204–211.
- SAHU, A.; PAUL, B. (1998). The role of dietary whole sugar-jaggery in prevention of respiratory toxicity of air toxics and in lung cancer. *Toxicology Letters*, v. 95, n. 1, p. 154.
- SANTAMARIA, H. R. (2012). Evaluación mediante indicadores productivos y energéticos de tres módulos de producción de panela granulada. Trabajo de Conclusão de Curso (Engenharia Mecânica-Elétrica). Facultad de Ingeniería. Área Departamental de Ingeniería Mecánico-Eléctrica. Universidad de Piura, Piura, Peru.
- SATÍN, M. (2018). Evaluación del contenido de acrilamida durante el procesamiento de panela granulada y propuesta de reducción. Trabajo de Conclusão de Curso

- (Engenharia Mecânica-Elétrica). Facultad de Ingeniería. Área Departamental de Ingeniería Mecánico-Eléctrica. Universidad de Piura, Piura, Peru.
- SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE AOPIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. (2016). O processo de fabricação da rapadura. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-processo-de-fabricacao-da-rapadura,9be9438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- SIROT, V. et al. (2012). Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 889–894.
- SOLÍS, J. et al. (2006). Descripción de un proceso tecnificado para la elaboración de piloncillo a partir de caña de azúcar. *e-Gnosis*, v. 4, n. 1, p. 1–8.
- STADLER, R. et al. (2002). Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, v. 419, p. 449–450.
- STADLER, R.; GOLDMANN, T. (2008). Chapter 20 Acrylamide, Chloropropanols and Chloropropanol Esters, Furan. Handbook: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Edited by Yolanda Picó, Elsevier, v. 51, p. 705-732.
- STADLER, R.; STUDER, A. (2015). Chapter 1. Acrylamide Formation Mechanisms. In: *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. Elsevier. p. 1–17.
- STADLER, R; SCHOLZ, G. (2004). Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, v. 62, n. 12, p. 449-467.
- STEFANOVIC, S.; ĐORDEVIC, V.; JELUSIC, V. (2017). Rapid and reliable QuEChERS-based LC-MS/MS method for determination of acrylamide in potato chips and roasted coffee. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 85, 012010, p. 1-6.
- SUNG, W. C. et al. (2020). Influence of caramel and molasses addition on acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation and sensory characteristics of non-centrifugal cane sugar during manufacturing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, n. 12, p. 4512-4520.
- SURMA, M. et al. (2017). Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. *Microchemical Journal*, v.131, p. 98-102.

- TAREKE, E. et al. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 17, p. 4998–5006.
- VARGAS, J. et al. (2014). Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida. *Revista Ciencia en Desarrollo*, v. 5, n. 2, p. 99-106.
- VARGAS, K. (2016). El aguapanela, una bebida muy rica y con muchas bondades. Disponível em: <<https://www.elcampesino.co/el-aguapanela-una-bebida-muy-rica-y-con-muchas-bondades/>>. Acesso em: 14 abr. 2019.
- VELASQUEZ, F. et al. (2019). Non-centrifugal cane sugar processing: A review on recent advances and the influence of process variables on qualities attributes of final products. *Journal of Food Engineering*, v. 255, p. 32-40.
- VIRK-BAKER, M. et al. (2014). Dietary acrylamide and human cancer: A systematic review of literature. *Nutrition and Cancer*, v. 66, n. 5, p. 774–790.
- WAWRZYNIAK, R.; JASIEWICZ, B. (2019). Straightforward and rapid determination of acrylamide in coffee beans by means of HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry*, v. 301, 125264, p. 1-6.
- WEERAWATANAKORN, M. et al. (2016). Physico-chemical properties, wax composition, aroma profiles, and antioxidant activity of granulated non-centrifugal sugars from sugarcane cultivars of Thailand. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, p. 4084–4092.
- WEISSHAAR, R. (2004). Acrylamide in heated potato products - Analytics and formation routes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 106, n. 11, p. 786–792.
- YANG, T.; HUANG, K. (1983). The preliminary study of free amino acids in green tops of sugar cane. Disponível em: <[http://www.issct.org/pdf/proceedings/1983/1983 Tao-tze The Preliminary Study of Free Amino Acids in Green Tops of Sugar Cane.pdf](http://www.issct.org/pdf/proceedings/1983/1983%20Tao-tze%20The%20Preliminary%20Study%20of%20Free%20Amino%20Acids%20in%20Green%20Tops%20of%20Sugar%20Cane.pdf)>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- YAYLAYAN, V. A.; WNOROWSKI, A.; PEREZ, L. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1753–1757.
- YOSHIOKA et al., (2019). A highly sensitive determination method for acrylamide in beverages, grains, and confectioneries by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 294, p. 486-492.
- ZHOU, P. et al. (2013). Dietary exposure of the Chinese population to acrylamide. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 26, n. 6, p. 421–429.

ZYZAK, D. et al. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 4782–4787.

**CAPITULO 2 – ACRILAMIDA EM AÇÚCAR NÃO CENTRIFUGADO
(RAPADURA) NA AMÉRICA LATINA: VALIDAÇÃO
INTRALABORATORIAL DE UM MÉTODO LC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO NO BRASIL E NA COLÔMBIA**

A ser submetido para a revista *Food Additives & Contaminants*

Acrylamide in non-centrifugal sugar from Latin American markets: in-house validation of an LC-MS/MS method and dietary exposure assessment in Brazil and Colombia

S.J. Henao, M.H. Petrarca, P.A.C. Braga, A.P. Ariseto *

Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author: E-mail address: *pavesi@unicamp.br*

A ser submetido para a revista *Food Additives & Contaminants*.

Abstract

A liquid chromatography tandem mass spectrometry analytical method (LC-MS/MS) preceded by a rapid and simple QuEChERS-based sample preparation was developed and validated for the determination of acrylamide in non-centrifugal sugar (NCS). Adequate linearity in calibration curves, selectivity and sensitivity were achieved. A limit of detection (LOD) and a limit of quantitation (LOQ) of 10 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, were obtained. Recoveries (84.3–107.5%) and coefficients of variation ($\text{CV} < 15\%$) for repeatability and reproducibility conditions were suitable in intraday and interday laboratory conditions. The content of acrylamide was determined in 76 commercial samples of NCS from different Latin America countries and ranged from <20 to 1414 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The highest mean acrylamide amounts were found in samples from Peru, Ecuador and Colombia (636 ± 418 , 446 ± 337 and $401 \pm 278 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively). Considering the form of the product, the highest average levels were found in granulated NCS ($517 \pm 313 \mu\text{g kg}^{-1}$) when compared to block ($294 \pm 262 \mu\text{g kg}^{-1}$). Within the Colombian samples, organic NCS, made with natural flocculant, presented a higher acrylamide mean content ($721 \pm 217 \mu\text{g kg}^{-1}$) than conventional samples ($363 \pm 261 \mu\text{g kg}^{-1}$). Although the Margin of Exposure (MOE) values for neurotoxicity suggested that the estimated intakes in Brazil and Colombia are not a concern, MOEs obtained for neoplastic effects raised attention.

Keywords: Process contaminant; Maillard reaction; *panela*; *rapadura*; unrefined sugar; risk assessment.

1. Introduction

Non-centrifugal sugar (NCS), the technical denomination used by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 1994), is a solid product obtained from the evaporation, concentration and crystallization of sugarcane juice (*Saccharum officinarum* L.), up to a concentration higher than 90 °Brix (FAO, 2014). The NCS elaboration process can vary from country to country, but it is always characterized by a predominantly rural, traditional and artisanal production, little organized, with low rates of introduction of mechanized technologies, in which the process conditions and characteristics of the final product are not controlled (Mujica, Guerra & Soto, 2008; Castellanos, Torres & Flórez, 2010).

The NCS is known by different names such as *jaggery* or *gur* (South Asia), *panela* (Colombia, Ecuador), *rapadura* (Brazil), *piloncillo* (Mexico), *muscovado* (Philippines) and *kokuto* (Japan), and has been traditionally consumed as a sweet and/or sweetener in sugarcane producing regions, being commercialized in granulated or block forms (Jaffé, 2013). Block is the main form of distribution worldwide, but it is less suitable for food applications (Weerawatanakorn et al., 2016).

According to data from FAOSTAT (2017), 32 countries in the world produce NCS, with India being responsible for 60.4% of global production, followed by Colombia with 12.2%, which is also the world's largest consumer with about 19 kilos per year per capita (ICBF, 2020). Brazil is the fourth largest global producer with 494 thousand tons and has an average consumption of 0.121 kilos per capita per year (IBGE, 2011).

Beneficial health properties have been attributed to NCS, such as bioactive product with antioxidant activity due to its content of phenolic compounds and flavonoids (Meerod, Weerawatanakorn & Pansak, 2019; Iqbal et al., 2017; Asikin et al., 2016; Weerawatanakorn et al., 2016) that promote, together with the presence of Fe and Cr, immunological and cytoprotective effects (Jaffé, 2012), making it a healthier alternative to traditional sugar or other artificial sweeteners as well as an interesting product for export (FAO, 2014).

The Maillard and caramelization reactions that are triggered with high temperatures are the main chemical transformations during the production of NCS, through which its characteristic color and flavor are generated (Mesías et al., 2020; Vargas et al., 2014). In parallel, the presence of reducing sugars and free asparagine in

the sugarcane juice, besides a pH between 5.0 and 6.0, are favorable conditions for the formation of compounds of toxicological interest such as acrylamide, which is a neurotoxic, carcinogenic and genotoxic contaminant that also produces adverse reproductive effects identified during experimental studies in animals (EFSA, 2015). According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), acrylamide has been classified as a probable human carcinogen (group 2A) (IARC, 1994).

Carbohydrate-rich foods have been the main products investigated for the presence of acrylamide; however, there are still few studies on the levels of this contaminant in NCS, in which values ranging between <1.2 and $3058 \mu\text{g kg}^{-1}$ have been determined, with the highest concentrations observed in samples from Colombia, Peru and Japan (Gómez-Narváez et al., 2019; Satín, 2018; Kawahara et al., 2018).

Analytical methods to determine acrylamide in NCS have already been reported by some authors. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) are the main employed techniques due to their high accuracy and sensitivity, as well as good stability and reproducibility (Pan et al., 2020). Solutions of Carrez I and Carrez II followed by solid-phase extraction (SPE) on Oasis-HLB® cartridges for cleanup are mainly used (Pan et al., 2020; Gómez-Narváez et al., 2019; Mesías et al., 2020), with disadvantages such as high costs, quantitative transfers, and/or multiple SPE cleanups. The QuEChERS-based sample preparation method proposed by Mastovska and Lehotay (2006) has not been employed to determine acrylamide in sugars so far, but some authors demonstrated that this approach can be successfully applied to different matrices (Andačić et al., 2020; Dibaba et al., 2018; Surma et al., 2017; Petrarca et al., 2017).

In this context, the objective of the present study is to evaluate the acrylamide levels in NCS produced and commercialized in different countries in Latin America, including Brazil, Colombia, Ecuador, Mexico, Peru and Bolivia, through the validation of an analytical method using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) preceded by a rapid and simple QuEChERS-based sample preparation. In addition, the work also describes an exposure assessment to acrylamide through the consumption of NCS in Brazil and Colombia, as well as the risk characterization using the Margin of Exposure (MOE) approach.

2. Material and methods

2.1. Analytical standards

Acrylamide (99%) and 2,3,3-*d*₃-acrylamide (98%) standards were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) and Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA), respectively. Stock standard solutions of acrylamide (1000 µg mL⁻¹) and *d*₃-acrylamide (100 µg mL⁻¹) were prepared in ultrapure deionized water and stored at -18 °C. Working standard solutions were prepared weekly by diluting stock standard solution with ultrapure water at concentrations of 2.5 µg mL⁻¹ for acrylamide and 5, 25 and 50 µg mL⁻¹ for *d*₃-acrylamide, which were stored at 4 °C.

2.2. Reagents and consumables

Acetonitrile HPLC grade was purchased from J.T Baker® (Phillisburg, NJ, USA), formic acid (98-100%) was provided by Merck® (Darmstadt, Germany) and ultrapure water was obtained through a Milli-Q water purifier system (Millipore, Bedford, MA, USA). Sodium chloride (NaCl) and anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄), both high-purity grade, were purchased from Sigma-Aldrich®. Primary secondary amine (PSA) sorbent was provided by Supelco® (Bellefonte, PA, USA) and PTFE syringe filters (13mm x 0.22µm) were purchased from Analítica (São Paulo, SP, Brazil).

2.3. Samples

A total of 76 samples of non-centrifugal sugar, including different brands, batches and forms of presentation (block or granulated), was acquired from supermarkets and other retail markets located in different countries from Latin America, including Colombia (38), Brazil (16), Ecuador (12), Peru (6), Mexico (3) and Bolivia (1), between July 2018 and September 2019. The samples were maintained in their original packaging and stored at room temperature, protected from light and humidity, until analysis.

2.4. Sample preparation

Prior to extraction, the samples available commercially in block form were grated and homogenized. Then, 2.0 g of homogenized sample were weighed into a 50 mL polypropylene tube and a suitable volume of the internal standard solution was added to obtain 100 µg kg⁻¹ of *d*₃-acrylamide. The mixture was allowed to stand at room temperature for at least 15 min. Subsequently, 5 mL of water were added and the mixture

was vortexed for 10 min in order to dissolve the sample completely. Five milliliters (mL) of acetonitrile containing 0.01% formic acid were added followed by 0.5g of NaCl and 2g of anhydrous MgSO₄. After vigorous shaking for 1 min, the mixture was centrifuged for 5 min at 3500 g (centrifuge 5810R Eppendorf, Hamburgo, Germany). Then, 1 mL of the supernatant (acetonitrile extract) was transferred to a 1.5 mL tube containing 50 mg of PSA sorbent and 150 mg of anhydrous MgSO₄. The mixture was vortexed for 30 s and centrifuged for 1 min at 12000 g (microcentrifuge Gyrozen©, Daejeon, Korea). The supernatant was collected and filtered using a 0.22 µm PTFE membrane into a vial for injection into the LC-MS/MS system. The analyses were performed in duplicate and those samples containing acrylamide content exceeding 220 µg kg⁻¹ were diluted up to 10 times with blank matrix extract.

2.5. LC-MS/MS analysis

An ultra-high performance liquid chromatography system (UHPLC 1290 Agilent Technologies, CA, USA) coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source operating in positive mode (6460 Agilent Technologies, CA, USA) was used for the determination of acrylamide. The chromatographic separation was achieved using a C8 column (2.1 x 100mm, 1.8µm; Zorbax RRHDSB, Agilent Technologies, CA, USA) maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.01% formic acid, and the elution was performed using a linear gradient as follows: 0 min, 5% B; 5 min, 50% B; 5.01-6 min 5% B; resulting in a total run time of 6 min with additional 7 min of post run time to stabilize the column with the initial conditions. The flow rate and the injection volume were 0.3 mL min⁻¹ and 1 µL, respectively. The ESI conditions were as follows: gas temperature, 300 °C; gas flow, 12 L min⁻¹; nebulizer 35 psi; sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow, 12 L min⁻¹; capillary voltage, 2 kV. Nitrogen gas was used as nebulizing, desolvation and collision gas. The data acquisition was carried out using Mass Hunter software workstation (version 8.00, Agilent Technologies, CA, USA) and the identification and quantitation of acrylamide in the samples were performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. Source Optimizer and Optimizer tools were used to set the ESI source conditions and establish the quantifier and qualifier transitions as well as the best collision energies, respectively. For acrylamide, *m/z* 71.08 (precursor) and *m/z* 55.1 – and *m/z* 44.1 (products) were monitored, whereas *m/z* precursor 75.1 and products 58.1 - 44.1 were used for *d*₃-acrylamide. The fragmentor used was 40

and the collision energies were 9V for quantifier transitions and 17V for qualifier transitions.

2.6. Method validation

The performance characteristics of the analytical method were established through an in-house validation procedure, including selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity, trueness and precision, under repeatability and within-laboratory reproducibility conditions (Eurachem, 2014). For this, a non-centrifugal sugar sample, in which acrylamide concentration was low ($< \text{LOQ}$), was used as a blank representative matrix to obtain the calibration curves and to prepare the fortified samples for recovery and precision tests. The fortified samples were prepared on the same day at 20, 100 and 220 $\mu\text{g kg}^{-1}$. To obtain a better interaction between the analyte and the blank matrix, the fortified samples were allowed to stand at room temperature for at least 1 h before the extraction procedure. Calibration curves, in the range 20–220 $\mu\text{g kg}^{-1}$, were prepared in solvent (acetonitrile containing 0.01% formic acid) to estimate the matrix effect, in blank matrix extract to evaluate the recovery and precision of the method, and in blank matrix to quantify the commercial samples. All analytical curves included six concentration levels each, which were constructed by plotting acrylamide/ d_3 -acrylamide peak area ratio against concentration levels. The calibration curves were constructed using standard solutions of 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of d_3 -acrylamide and 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of acrylamide.

2.7. Exposure assessment and risk characterization

The acrylamide intake was estimated by combining data of total *per capita* consumption of NCS from Brazil and Colombia with the acrylamide contents determined in the present study for the respective countries. Exposure assessments for the other countries were not carried out due to the limited number of samples analyzed and/or unavailability of consumption data.

Brazilian consumption data were obtained from a Household Budget Survey (POF 2008-2009) conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) between 2008 and 2009 (IBGE, 2011). The consumption data were collected from 13,569 selected households, covering the main Brazilian regions (North, Northeast, Central-West, Southeast and South), including 34,003 household members with 10 or more years of age. Thus, individual consumption data were recorded on two non-consecutive days

for all foods (including ready meals and beverages) consumed over 24 hours, as well as the quantities consumed in units of homemade measure, the form of preparation and the consumption at home or outside home. Finally, the reported consumption data, expressed in kg of food per capita per year, was available for the total Brazilian population as well as for each Brazilian region. Since the Ceará State (localized in the Northeast region from Brazil) presented the highest *per capita* consumption of NCS of the country, particularly, this data was used to simulate the “worst scenario” of exposure. An adult weight (18 to 75 or more years old) standard of 66 kg was considered in the calculations (IBGE, 2011).

Colombian consumption data were obtained from a national survey of the nutritional situation 2015 (ENSIN 2015), conducted by the Colombian Institute of Family Welfare (ICBF), Ministry of Health and Social Protection (Minsalud) and the National University of Colombia (UNAL) between 2015 and 2016. For the analysis of dietary intake of the ENSIN, the 24-hour recall method (R24) was used, which consists of the individual application of a detailed interview on all the foods and beverages consumed during the 24 hours of the day prior to the interview (ICBF, 2020).

The dietary intake information for ENSIN 2015 was obtained from a sample of 34,096 people from 0 to 64 years old, including pregnant women. Likewise, in order to estimate the population distribution of the usual intake and adjust for intra-individual variability, a second recall was carried out on 11.9% of the population (4,612 people). To guarantee independence between the observations, the two interviews were made on non-consecutive days, with intervals between 48 and 72 hours. Finally, the reported consumption data, expressed in grams per capita per day, were classified by regions (Atlantic, Central, Eastern, Orinoquía-Amazonía, Pacific and Bogotá) and by age group (1 to 4 years, 5 to 12 years, 13 to 17 years and 18 to 64 years). For the present study, the group of pregnant women was not taken into account. The body weights used for the calculations were 13.7 kg (1 to 4 years), 29.7 kg (5 to 12 years), 53.4 kg (13 to 17 years) and 69.2 kg (18 to 64 years), corresponding to the average by age range reported in the same survey (ENSIN 2015).

For each exposure scenario, different situations were simulated considering the mean, the median and the 95th percentile (P95) of the acrylamide content in the analyzed samples. Analytical results below the LOQ were replaced by 1/2 LOQ, that is $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, since the number of samples with results below the LOQ was less than 60% of the total number of samples (WHO, 2002).

For the risk characterization of genotoxic and carcinogenic compounds, such as acrylamide, the margin of exposure (MOE) value is considered appropriate and it can be calculated through the relationship between toxicological reference values and the estimated levels of intake. For peripheral neuropathic effects, the estimated intakes were compared with the BMDL₁₀ values of 0.43 mg kg⁻¹ of body weight (bw) per day and for tumours in the Harderian gland adenomas of male mice (neoplastic effects), a value of 0.17 mg kg⁻¹ bw per day was used, as suggest by the European Food Safety Authority (EFSA) (2015).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Minitab® Statistical Software version 19 (State College, Pennsylvania, USA). Data were expressed as mean ± deviation estimative. The statistical significance was checked through analysis of variance (ANOVA one-way) followed by Tukey's test at the 95% confidence level. All statistical parameters were evaluated at $p < 0.05$ significance level.

3. Results and discussion

3.1. Method performance characteristics

In the determination of acrylamide in complex matrices using low-resolution LC-MS/MS systems, the method selectivity has been a decisive parameter for the distinction of the contaminant from potential matrix interfering compounds with the same fragmentation profile (Petrarca et al., 2017; Bermudo et al., 2008; Şenyuva & Gökmen, 2006). As reported by Şenyuva & Gökmen (2006) and Bermudo et al. (2008), a potential interfering compound in the analysis of acrylamide is the amino acid valine. By the injection of a mixture of valine and acrylamide solution in acetonitrile at $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, using the pre-established liquid chromatographic conditions, a complete separation between the acrylamide peak ($t_r = 1.27 \text{ min}$) and the co-extracted valine ($t_r = 1.06 \text{ min}$) was achieved demonstrating the ability of the analytical method to determine unequivocally the acrylamide in NCS samples, thus minimizing the chances of false positives (Figure 1).

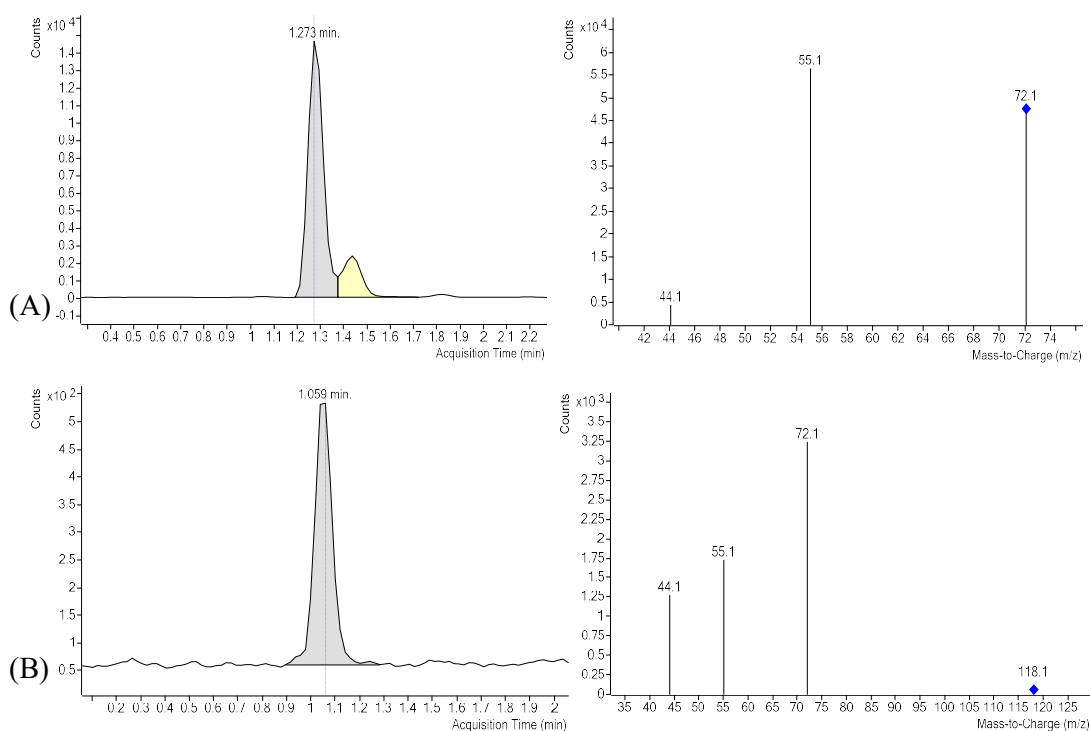


Figure 1. Chromatogram and mass spectrum with precursor and product ions of a standard solution of (A) acrylamide and (B) valine in solvent at a concentration of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Linearity was evaluated in solvent, extract and matrix-matched calibration curves, which included six concentration levels each and were injected in triplicate. Solvent calibration curve was prepared in acetonitrile containing 0.01% formic acid at 8, 24, 40, 56, 72 and 88 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration levels. For extract and matrix-matched calibration curves, suitable volumes of working standard solution were added to non-centrifugal sugar extract and sample with acrylamide level lower than LOQ, respectively, providing concentration levels of 20, 60, 100, 140, 180 and 220 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of standard equivalent in the sample. Adequate linearity between the concentration level and the analytical response was verified for all calibration curves with linear correlation coefficients (r) above 0.99 (Table 1). No outlier values were identified and homoscedasticity was verified in the analytical responses using the Grubbs test ($p = 0.05$) and Cochran's C test ($p = 0.05$), respectively.

Matrix effect (ME) was estimated using the equation: $\text{ME (\%)} = [(\text{SE}-\text{SS})/\text{SS}] \times 100$, where SE is the slope obtained from the extract calibration curve and SS is the slope obtained from the solvent calibration curve. A low matrix effect of 10.9% was observed (Table 1), then matrix-matched calibration curves were used to compensate the matrix-induced increment on the acrylamide signal and thus for quantification purposes.

The LOD was established as the smallest content of acrylamide (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) that was reliably detectable in the spiked NCS extracts and that could be distinguished from the noise, but not necessarily quantifiable. The LOQ was set as the lowest content of acrylamide (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) that could be detected and quantified in the NCS samples with acceptable values of trueness and precision, as can be seen in the Table 1. This LOQ value has been reported in previous studies of acrylamide in Brazilian foods (Arisseto et al., 2007), baby foods (Petrarca et al., 2017) and biscuits commercialized in Spain (Mesías, Morales & Delgado-Andrade, 2019).

The accuracy of the method was evaluated through spiking/recovery experiments using a NCS sample with acrylamide level lower than LOQ, which was spiked with a properly amount of the working standard solution providing concentrations of 20, 100 and 220 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of standard equivalent in the sample. A total of six independent replicates at each level was analyzed on the same day and the mean recovery values ranged between 84.3 and 107.5% (Table 1). According to the European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002), recoveries from 80 to 110% are acceptable at spiked levels above 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

The precision, expressed as coefficient of variation (CV%), was assessed under repeatability and within-laboratory reproducibility conditions. A total of six independent replicates at each level was analyzed on the same day under the same chromatographic conditions, with intraday-precision values ranging from 2.0 to 14.7% (Table 1). Under within-laboratory reproducibility conditions, the interday-precision values varied from 6.4 to 12.5% (Table 1), which were obtained from 12 independent replicates at each level analyzed on two different days by the same analyst under the same chromatographic conditions. All CV% values obtained were lower than 15%, as recommended by the European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002).

Table 1. Method validation parameters for acrylamide quantification in non-centrifugal sugar by LC-MS/MS.

Parameter	Acrylamide	
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10	
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	20	
Matrix effect (%)	10.9	
Linearity (20-220 $\mu\text{g kg}^{-1}$)*	$r > 0.99$	
Recovery ($n = 6$, %)		
20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100.2	
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	84.3	
220 $\mu\text{g kg}^{-1}$	107.5	
Precision (CV, %)	Intra-day ($n = 6$)	Inter-day ($n = 12$)
20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	14.7	12.5
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	9.0	6.4
220 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2.0	9.2

LOQ: limit of quantification; LOD: limit of detection; r : correlation coefficient; CV: coefficient of variation. * Matrix-matched calibration curve.

3.2. Acrylamide levels in non-centrifugal sugar (NCS)

The occurrence of acrylamide was investigated in 76 commercial samples of NCS from Colombia, Brazil, Ecuador, Peru, Mexico and Bolivia, including only samples without addition of flavoring or other flavor additives. Acrylamide was detected in 100% of the samples analyzed, whose contents ranged from $< \text{LOQ}$ (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) to 1414 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with average and median concentrations of 379 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 314 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The majority of the samples (96.1%) contained acrylamide above the LOQ of 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The individual values are presented in the Figure 2.

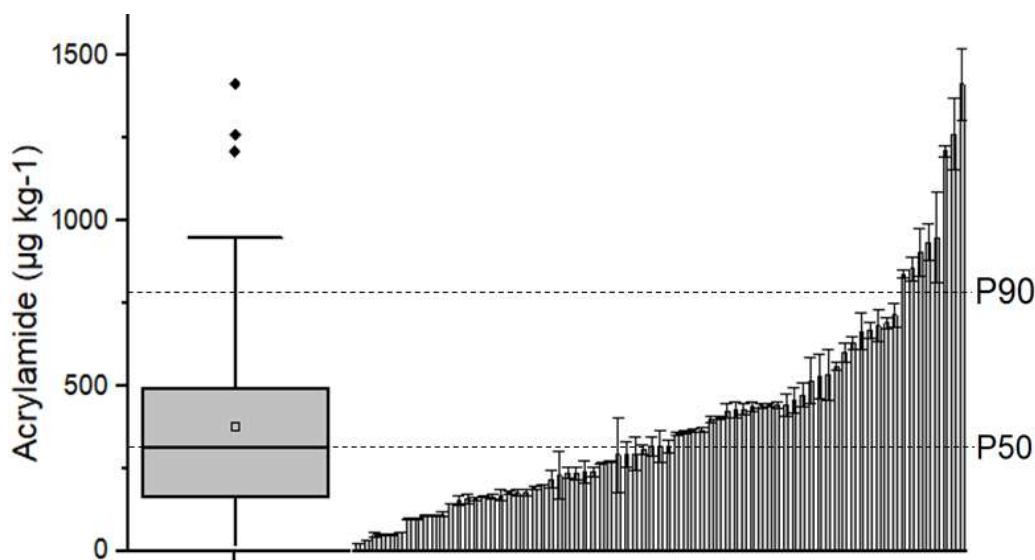


Figure 2. Acrylamide content in non-centrifugal sugar ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Values are mean \pm deviation. Dotted lines indicates the median (P50) and the 90th percentile (P90).

The highest amounts of acrylamide were detected in samples from Peru, Ecuador and Colombia, with average contents of 636, 446 and 401 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively (Table 2). In contrast, samples from Mexico, Bolivia and Brazil presented the lowest levels, with average contents of 147, 155 and 240 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Nevertheless, only three samples from Mexico and one sample from Bolivia were analyzed, which is insufficient to obtain a clear conclusion about the behavior of acrylamide in NCS of these countries. It is important to note that countries with higher levels of acrylamide contained samples in granulated and block form, while countries with lower levels only presented block samples.

Our findings support previous studies on acrylamide in NCS samples reported by Gómez-Narváez et al. (2019) and Invima (2018), whose contents ranged between 60 and 3058 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 29 to 2762.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Similar results (35 –2325 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were also reported in brown sugar samples from Japan (Kawahara et al., 2018). On the other hand, a maximum acrylamide level of 180.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ was found in brown sugar from the Inner Mongolia region in China (Gao et al., 2016).

Table 2. Occurrence of acrylamide in non-centrifugal sugar.

	No. of samples	Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Minimum-Maximum	Mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	P95
<i>Total</i>	76	314	<LOQ – 1414	379 ± 301	939
<i>Country</i>					
Brazil	16	234	<LOQ – 855	240 ± 229	546
Colombia	38	319	<LOQ – 1210	401 ± 278	910
Ecuador	12	394	113 – 1262	446 ± 337	1090
Peru	6	544	178 – 1414	636 ± 418	1233
Mexico	3	98	52 – 292	147 ± 128	273
Bolivia	1	NA	155	155	NA
<i>Form</i>					
Granulated	29	443	113 – 1414	517 ± 313 a	1137
Block	47	237	<LOQ – 1210	294 ± 262 b	891
<i>Colombian Type</i>					
Organic	4	753	441 – 936	721 ± 217 a	902
Conventional	34	303	<LOQ – 1210	363 ± 261 b	782

NA: not applicable; P95: 95th percentile; Different lowercase letters represent different means, in the same column, by Tukey test with significant difference with 95% confidence level ($p < 0.05$).

Differences in the acrylamide levels can be partially explained due to the variations on precursor contents in the sugarcane, such as reducing sugars and the amino acid asparagine, which are associated to sugarcane genotypes, fertilization, harvest, soil types, maturity stage, among others (Velásquez et al., 2019). Normally, ripe sugarcane presents a high content of sucrose and minimum concentration of reducing sugars (Olimpio, 2014). In addition, an increment in the quantity of reducing sugars in molasses has been related with the nitrogen fertilization of sugarcane soils (Morales-Ramos, Osorio-Mirón & Rodríguez-Campo, 2017). Other important factors include the time between sugarcane cutting process and the milling, as well as the pH of the sugarcane juice before clarification, which is neutralized using pH regulators until reaching a pH close to 6.0. Both factors prevent the sucrose inversion reaction, thus avoiding an increase in the content of reducing sugars available for the formation of acrylamide and fungal contamination, contributing to the shelf life of the NCS samples (Morales-Ramos, Osorio-Mirón & Rodríguez-Campo, 2017; Dezfily, Mahadevaiah & Demappa, 2013; Solomon et al., 2006).

According to the Commission Regulation (EU) 2017/2158 (EC, 2017), benchmark levels are performance indicators to be used to verify the effectiveness of the

mitigation measures and are based on experience and occurrence for broad food categories. The concentration of acrylamide at percentiles 90 or 95 could be proposed as benchmark level, suggesting that they can usually be lowered by applying good manufacturing practices. Mesías and Morales (2015), in a study of acrylamide in commercial potato crisps from the Spanish market, indicated that the definition of signal values (P90, percentile 90) is useful for companies to monitor the success during the application of mitigation strategies, if any. Three levels have been defined, namely: i) acceptable (value < P50); ii) for evaluation (P50 < value < P90); and iii) unacceptable (value > P90). In our study, 10% of the samples exceeded 777 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (P90), value that could be proposed as a benchmark level and from which strategies should be devised to mitigate acrylamide formation (Figure 2).

The technological process is another factor that can influence on the acrylamide content. As can be seen in the Table 2 and Figure 3, the highest levels of acrylamide ($p < 0.05$) were found in the granulated NCS (mean = 517 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and median = 443 $\mu\text{g kg}^{-1}$) when compared to the block product (mean=294 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and median=237 $\mu\text{g kg}^{-1}$). These results are similar to those reported by Gómez-Narváez et al. (2019), whose average content in the granulated and block products were 812 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 540 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Probably, the highest levels of acrylamide in the granulated product are due to the higher temperatures used for its production. In the processing of NCS, the sugarcane juice is boiled to evaporate the water and concentrate the soluble solids, from 16-20 °Brix (initial) to 90-94 °Brix (final). Thus, temperatures between 120 and 130 °C are applied to obtain the concentrated sugarcane juice (90 to 92 °Brix) used for the preparation of the block products, whereas higher temperatures (from 126 to 132 °C) are required to obtain 94 °Brix for granulated products; however, these values can vary up to 2 °C according to the altitude, the purity, the type of technology implemented, the energy efficiency of the process and the operation conditions (Velásquez, 2019; Rozo, 2013). The time and temperature employed in the thermal process contribute to a maximum moisture content of 9% and 5% in block and granulated products, respectively (CAC, 2019).

It is noteworthy to mention that according to Figure 3, the NCS in a granulated form presents a less controlled process than the NCS in block, which can be explained because the manufacturing processes are artisanal and the thermal efficiency of the process varies greatly depending of the type of equipment used (open evaporators (pans) or horizontal/vertical stirred film evaporators), affecting the residence times of the

sugarcane juice in the evaporation and concentration stages, which has a great impact on the formation of acrylamide (Velásquez, 2019).

NCS in block format, available in different sizes, has been the main form of distribution of the product around the world, though NCS granulated presents some advantages such as easier dosing, increased solubility and storage stability (Mujica, Guerra & Soto, 2008). Nonetheless, Colombian, Ecuadorian and Peruvian producers have exported granulated NCS to South Korea, Spain, Italy, Australia, Canada, United States of America and Argentina, whose expansion of the international market depends on maintaining a standardized quality and acrylamide levels lower than 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (INS, 2012).

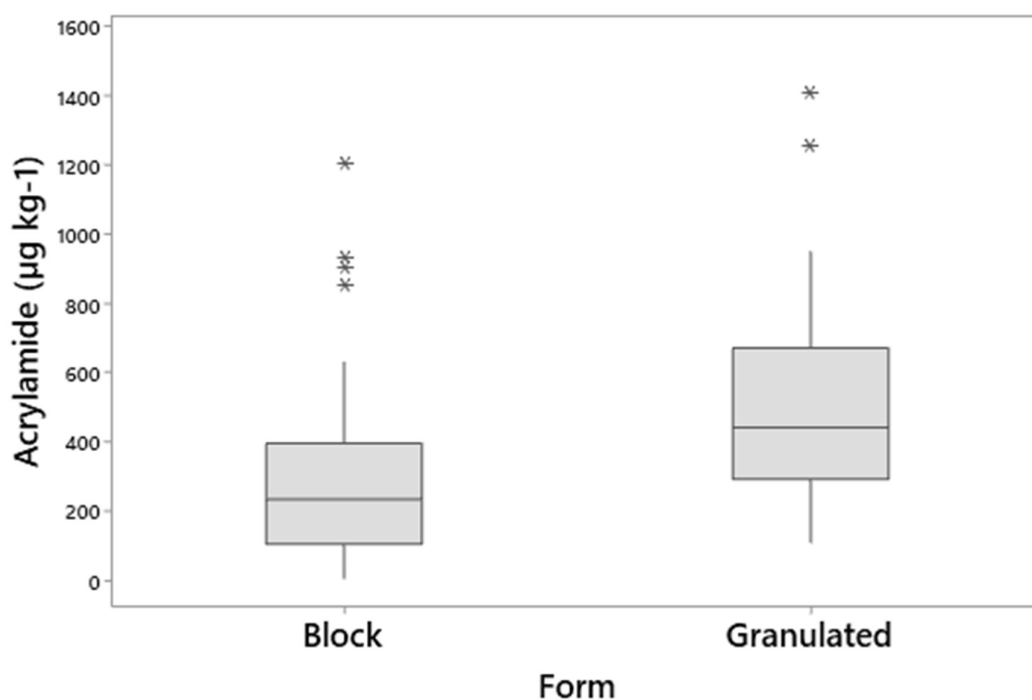


Figure 3. Acrylamide content in non-centrifugal sugar commercially available as block or granulated.

According to the information declared in the product packaging, the Colombian NCS samples were classified as organic ($n = 4$) or conventional ($n = 34$) products. The highest average acrylamide content ($p < 0.05$) was found in the organic samples (Figure 4), possibly due to the type of flocculant used in the preparation of the product.

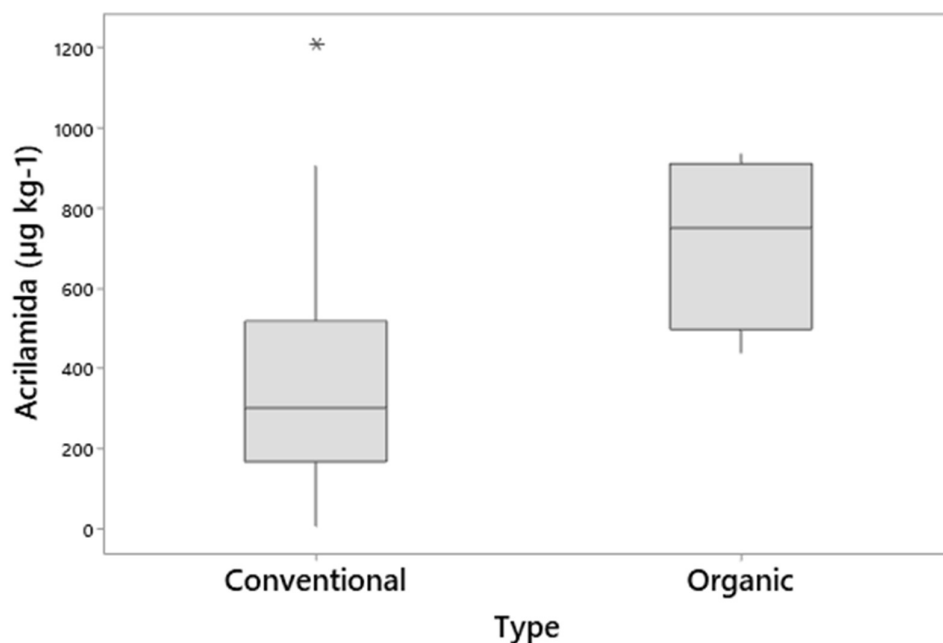


Figure 4. Acrylamide content in organic and conventional Colombian non-centrifugal sugar.

In order to remove the impurities present in the sugarcane juice (leaves, suspended impurities, coagulated proteins, waxes, colloids and pigmented substances, among others), in the Colombian factories, flocculant agents are used in the clarification stage of the process. Among these compounds, we highlight natural flocculants such as *balso* (*Heliocarpus americanus* L.), *cadillo* (*Triumfetta lappula*) and *guásimo* (*Guazuma ulmifolia* Lam), which are obtained from maceration of the bark of specific trees, as well as the long-chain artificial flocculants including polyacrylamide (Dezfuly, Mahadevaiah & Demappa, 2013). Studies suggest that the high levels of acrylamide detected in NCS samples may be related to the use of polyacrylamide as flocculant in the process, since this polymer may contain a certain amount of the unpolymerized acrylamide monomer and thus contaminate the product during the processing, as well other factors that could result in the degradation of polyacrylamide to acrylamide (Zhou et al., 2013; Ou et al., 2007). However, as shown in the Figure 4, the organic NCS samples, in which natural flocculant was used, presented an average acrylamide content ($721 \mu\text{g kg}^{-1}$) higher than the conventional samples ($363 \mu\text{g kg}^{-1}$). This can be explained by the fact that the natural flocculants are composed mainly of carbohydrates (fructose, glucose and maltose), thus increasing the amount of reducing sugars available for acrylamide formation (Ortiz et al., 2011).

3.3. Estimate of acrylamide intake and risk characterization from non-centrifugal sugar (NCS) consumption for the Brazilian and Colombian population

Data in Table 3 shows the *per capita* NCS consumption and the intake of the contaminant in Brazil calculated with the acrylamide levels determined in the present study (Table 2). The 95th percentil of acrylamide content in the samples was used in order to obtain the intake for high consumers.

Table 3. Consumption of non-centrifugal sugar and intake for the Brazilian population.

Regions ^a	Consumption (kg ano ⁻¹)	Intake ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$)		
		Mean	Median	P95
Total	0.121	0.001	0.001	0.003
Ceará State	0.865	0.009	0.008	0.020
North	0.053	0.001	0.001	0.001
Northeast	0.293	0.003	0.003	0.007
Center-West	0.07	0.001	0.001	0.002
Southeast	0.04	0.0004	0.0004	0.001
South	0.083	0.001	0.001	0.002

Acrylamide intakes for the total Brazilian population varied from $0.001 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ in the mean and median acrylamide levels to $0.003 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ in the 95th percentile (Table 3). For the different regions, the values ranged from 0.0004 to $0.003 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ in the mean/median acrylamide level and from 0.001 to $0.007 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ in the 95th percentile. The lower intake was observed in the Southeast region and the higher exposure was verified in the Northeast region, in which the Ceará State stands out, presenting values between $0.009 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ at the mean level of acrylamide and $0.020 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ at the 95th percentile. The large variations observed are due to differences in dietary habits and food preparation styles of each region.

According to Olimpio (2014), the NCS or “*rapadura*” is a product traditionally consumed by the population of the Brazilian Northeast region, especially in the State of Ceará, replacing other products such as refined sugar due to its high nutritional and low commercial value. The Northeast region is responsible for 70.6% of the NCS production and Ceará state is the main producer. The Southeast region represents 21.4% of the NCS national production, according to IBGE (2011). The consumption of NCS or “*rapadura*”

in Brazil is linked with social strata with low purchasing power and the product is considered a "poor food" (Olimpio, 2014). This fact could influence its consumption in regions such as the Southeast, which is 86% less than in the Northeast region.

In Colombia, the highest and lowest intake levels of acrylamide considering the consumption of NCS (or "*panela*") for the total population at the mean acrylamide concentration were observed for children between 1 to 4 years ($1.45 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$) and adults between 18 to 64 years ($0.33 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$), respectively (Table 4). The results were influenced by the higher consumption of the adults, lower body weight of children, and variations in the consumption of different regions.

Taking the different regions into account, the highest amounts per range age were found in children between 1 to 4 of the Pacific region ($1.61 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$), children between 5 to 12 years of the Central region ($0.77 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$), adolescents of the Central region ($0.47 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$) and adults of the Atlantic region ($0.40 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$) at the mean acrylamide level.

In Colombia, NCS or "*panela*" is a traditional product, consumed by 97% of the population in all socioeconomic strata (Celis, 2017). The product is consumed as a hot or cold drink, called "*aguapanela*" or "*agua de panela*", which can also be mixed with milk and offered to children in baby bottles (Vargas, 2016). According to the ENSIN 2015 study (ICBF, 2020), the frequency of consumption per person is between 1.8 to 1.9 times/day. Currently, the annual consumption of the product is between 18 to 21 kg per capita (ICBF, 2020), but 10 years ago it was around 32 kg per capita (Celis, 2017). This is due to new consumer trends, competition in the beverage segment and changing tastes, especially among young people.

The Central region, made up of the departments of Antioquia, Caldas, Caquetá, Huila, Quindío, Risaralda and Tolima, registered the highest consumption with approximately 22 kg per capita per year (ICBF, 2020). Santander (Eastern region) is the department with the most expressive production while the highest percentage of hectares of sugar cane planted is found in the department of Cundinamarca (Eastern region). The department of Cauca (Pacific region) has the largest number of producers (Celis, 2017).

Table 4. Consumption of non-centrifugal sugar and acrylamide intake for the Colombian population.

Regions	Age Group (years old)	Consumption (kg year ⁻¹)	Intake ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$)		
			Mean	Median	P95
Total	1 to 4	18.1	1.45	1.15	3.29
	5 to 12	18.4	0.68	0.54	1.54
	13 to 17	19.2	0.39	0.31	0.90
	18 to 64	20.6	0.33	0.26	0.74
Bogotá	1 to 4	15.2	1.22	0.97	2.77
	5 to 12	17.0	0.63	0.50	1.43
	13 to 17	14.1	0.29	0.23	0.66
	18 to 64	18.5	0.29	0.23	0.67
Atlantic	1 to 4	16.4	1.32	1.05	2.99
	5 to 12	17.7	0.65	0.52	1.49
	13 to 17	19.5	0.40	0.32	0.91
	18 to 64	25.5	0.40	0.32	0.92
Central	1 to 4	19.3	1.55	1.23	3.52
	5 to 12	21.0	0.77	0.62	1.76
	13 to 17	23.0	0.47	0.38	1.08
	18 to 64	23.6	0.37	0.30	0.85
Eastearn	1 to 4	16.8	1.35	1.07	3.06
	5 to 12	16.6	0.61	0.49	1.39
	13 to 17	17.4	0.36	0.29	0.81
	18 to 64	17.5	0.28	0.22	0.63
Orinoquía- Amazonia	1 to 4	14.4	1.15	0.92	2.62
	5 to 12	15.6	0.58	0.46	1.31
	13 to 17	16.8	0.35	0.28	0.79
	18 to 64	16.0	0.25	0.20	0.58
Pacific	1 to 4	20.1	1.61	1.28	3.66
	5 to 12	16.6	0.61	0.49	1.39
	13 to 17	18.8	0.39	0.31	0.88
	18 to 64	18.3	0.29	0.23	0.66

Few data on the population exposure to acrylamide from sugars can be found in the literature. In China, the maximum exposure was estimated at $0.005 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ in the Zhejiang province for the population of 18 – 45 years old with 63 kg body weight and the highest acrylamide levels found were derived from brown sugars (Gao et al., 2016). In Japan, an intake of $0.056 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ in the 95th percentile was estimated

from brown sugar (Kawahara et al., 2018). According to Barón (2016), the exposure to acrylamide in the Capital of Colombia (Bogotá) from NCS was estimated to be between 0.07 and 0.43 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$. The acrylamide intake reported by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2011) in refined sugar varied from 0.03 to 0.18 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$, according to commodities evaluated from the 13 GEMS/Food consumption cluster diets (revision June 2006) (mean body weight = 60 kg). In general, the exposure to acrylamide in Brazil due to the consumption of NCS is comparable with results obtained in other countries, except for the study reported by Barón (2016) for the Bogotá population (Colombia).

Exposure to acrylamide in Colombia is considerably higher than in the countries previously reported, due to the consumption habits of the population and the high acrylamide levels detected in NCS. The intake decreases with the age group, which is influenced by the increase in body weight. Barón (2016) obtained similar results.

Using the estimated acrylamide intakes and the BMDL₁₀ of 0.43 $\text{mg kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$, considered appropriate by EFSA CONTAM panel for peripheral neuropathy (EFSA, 2015), the risks of neurotoxicity were characterized for the total population of Brazil and Colombia. If the values of MOE are lower than 125 (safety threshold), a potential concern and considerable risk of neurotoxicity can be expected (EFSA 2015; Nematollahi et al., 2020).

All calculated MOEs for the total population of Brazil and Colombia were greater than the safety threshold (125) established for neurotoxic effects, as well as the MOEs for the state of Ceará (Brazil) and the Central region (Colombia), used as “worst scenarios” of exposure, except for children between 1 to 4 years in the Central and Pacific regions of Colombia at P95, for which the MOE values were 122 and 117, respectively. Therefore, it is possible to conclude that the neurotoxicity risk of acrylamide from NCS in the Brazilian and Colombian population may be negligible. Barón (2016) obtained similar results in the Bogotá population (Colombia).

The risk characterization of the neoplastic effects was calculated using the BMDL₁₀ of 0.17 $\text{mg kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ recommended by the EFSA CONTAM Panel (EFSA, 2015). The Committee concluded that, for substances that are both genotoxic and carcinogenic, a MOE of 10 000 or higher, based on a BMDL₁₀ from an animal study, and taking into account overall uncertainties in the interpretation, would be of low concern from a public health point of view (EFSA, 2015). Only the MOE values calculated for high consumers in Ceará State for the Brazilian population were lower than 10 000 (the

value obtained for 95th percentil was 8 671). For Colombian population, all MOE values obtained were lower than safety limit of 10 000, indicating a potential human health concern for these consumers. It is therefore necessary to continue efforts to reduce dietary exposure to acrylamide. Similar results were reported for the population of the Bogotá city (Colombia) in previous studies (Barón, 2016).

4. Conclusion

This study presents the first data on the occurrence of acrylamide, a genotoxic and carcinogenic compound, in samples of NCS sold in Brazil, in addition to the concentration levels of this contaminant in samples from Bolivia, Colombia, Ecuador, Mexico and Peru. A great variation in the content of acrylamide was observed between samples from different countries, which indicates that the content of the contaminant is dependent on the raw material used as well as on the product preparation process, which is still very artisanal and poorly controlled. The granulated NCS showed the highest levels of acrylamide when compared to the block product, whereas in the Colombian NCS samples declared as organic, higher levels of acrylamide were detected in comparison to the conventional NCS. The intake of acrylamide in Brazil was higher in the Ceará State and the value of the MOE indicated a potential health risk for high consumers in relation to neoplastic effects. On the other hand, the MOE values obtained for the Colombian population indicated a potential human health concern for all consumers, especially for children between 1 and 4 years. The results obtained may contribute to regulatory bodies for the definition of maximum limits for this contaminant in this type of food product as well as for the establishment of mitigation strategies to protect the consumer's health.

Acknowledgements

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Financial code (001).

References

- Andačić, I. M., Tot, A., Ivešić, M., Krivohlavek, A., Thirumdas, R., Barba, F. J., Sabolović, M. B., Kljusurić, J. G., & Brnčić, S. R. (2020). Exposure of the Croatian adult population to acrylamide through bread and bakery products. *Food chemistry*, 322, 126771, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126771>.
- Arisseto, A., Toledo, M., Govaert, Y., Loco, J., Fraselle, S. Weverbergh, E., & Degroodt, J. (2007). Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 236–241. <https://doi.org/10.1080/02652030601053170>
- Asikin, Y., Hirose, N., Tamaki, H., Ito, S., Oku, H., Wada, K. (2016). Effects of different drying–solidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of non-centrifugal cane brown sugar. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 340–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.039>.
- Barón, W. (2016). Acrilamida – Estudio de Consumo en Alimentos Bogotanos (Unpublished master's dissertation). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L. & Galceran, M. (2008). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products, *Talanta*, 76 (2), 389–394. ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.011>.
- CAC. Codex Alimentarius Commission. (2019). Proyecto de norma para el jugo de caña de azúcar deshidratado no centrifugado (CL 2019/34-CS). Roma.
- Castellanos, O., Torres, M. & Flórez, D. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la panela y su agroindustria en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Colombia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12695/> Accessed 20 August 2020.
- Celis, T. (2017). Un colombiano consume 19 kilos de panela cada año. <https://www.agronegocios.co/agricultura/un-colombiano-consume-19-kilos-de-panela-cada-ano-2622598#/> Accessed 23 August 2020.
- Dezfily, M., Mahadevaiah & Demappa, T. (2013). Effective of Different Flocculants on Fresh and Stale Sugarcane Juice Clarification. *Research Journal of Recent Sciences*, 2 (7), 48-52.

- Dibaba, K., Tilahun, L., Satheesh, N. & Geremu, M. (2018). Acrylamide occurrence in *Keribo*: Ethiopian traditional fermented beverage. *Food Control*, 86, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.016>.
- EC. European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221, 8–36. <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>.
- EC. European Commission. (2017). Commission Regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *OJ L 304*, 21.11.2017, 24–44. <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>.
- EFSA. European Food Safety. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13 (6): 4104, 1-321. doi:10.2903/j.efsa.2015.4104.
- Eurachem. (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second Edition. ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
- FAO. Food and Agriculture Organization. (1994). Sugar crops and sweeteners and derived products. <http://www.fao.org/es/faodef/fdef03e.HTM/> Accessed 8 July 2020.
- FAO. Food and Agriculture Organization. (2014). Procesados de productos diversos. Fichas técnicas. <http://www.fao.org/3/a-au171s.pdf/> Accessed 13 July 2020.
- FAOSTAT. (2017). New Foods Balances. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS/> Accessed 13 July 2020.
- Gao, J., Zhao, Y., Zhu, F., Ma, Y., Li, X., Miao, H., & Wu, Y. (2016). Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese Total Diet Study. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 87, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.013>.
- Gómez-Narváez, F., Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Contreras-Calderón, J., Ubillús, F., Cruz, G., & Morales, F. (2019). Occurrence of acrylamide and other heat-induced compounds in panela: Relationship with physicochemical and antioxidant parameters. *Food Chemistry*, 301, 125256, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125256>
- IARC. International Agency for Research on cancer. (1994). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Acrylamide. *IARC reMonographs*, Lyon, France, 60, 389-433.

- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf/> Accessed 20 August 2020.
- ICBF. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. (2020). Encuesta nacional de la situación nutricional ENSIN 2015. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/libro-ensin-2015.pdf/> Accessed 20 August 2020.
- Iqbal, M., Afzal Qamar, M., Bokhari, T.H., Abbas, M., Hussain, F., Masood, N., Keshavarzi, A., Qureshi, N., Nazir, A. (2017). Total phenolic, chromium contents and antioxidant activity of raw and processed sugars. *Information Processing in Agriculture*, 4 (1), 83-89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.inpa.2016.11.002>.
- INS. Instituto Nacional de Salud. (2012). Concepto científico acrilamida en panela. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Concepto-poliacrilamida-en-panela.pdf/> Accessed 20 August 2020.
- INVIMA. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. (2018). Informe de resultados del plan nacional subsectorial de vigilancia y control de acrilamida en alimentos procesados durante los años 2015-2016. Gobierno de Colombia. <https://www.invima.gov.co/documents/20143/440892/INFORME-ACRILAMIDA.pdf/7c18507c-d593-44c6-eb32-93be35fa8378?t=1560290190255/> Accessed 6 April 2020.
- Jaffé, W. (2012). Health Effects of Non-Centrifugal Sugar (NCS): A Review. *Sugar Tech*, 14, 87–94. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0145-1>.
- Jaffé, W. (2013). Non centrifugal sugar: world production and trade. <http://www.panellamonitor.org/documents/558/non-centrifugal-sugar-world-production-and-trade/> Accessed 8 July 2020.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting World Health Organization.
- Kawahara, J., Imaizumi, Y., Kuroda, K., Aoki, Y., & Suzuki, N. (2018). Estimation of long-term dietary exposure to acrylamide of the Japanese people. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 35(9), 1689–1702. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1484179>.

- Mastovska, K., & Lehotay, S. J. (2006). Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7001–7008. <https://doi.org/10.1021/jf061330r>.
- Meerod, K., Weerawatanakorn, M. & Pansak, W. (2019). Impact of Sugarcane Juice Clarification on Physicochemical Properties, Some Nutraceuticals and Antioxidant Activities of Non-centrifugal Sugar. *Sugar Tech*, 21 (3), 471–480. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0646-7>.
- Mesías, M., Delgado-Andrade, C., Gómez-Narváez, F., Contreras-Calderón, J., & Morales, F. J. (2020). Formation of Acrylamide and other Heat-Induced Compounds during Panela Production. *Foods*, 9(4), 531. <https://doi.org/10.3390/foods9040531>.
- Mesías, M., Morales, F & Delgado-Andrade, C. (2019). Acrylamide in biscuits commercialised in Spain: a view of the Spanish market from 2007 to 2019. *Food & Function*. 10, 6624-6632. <https://doi.org/10.1039/C9FO01554J>
- Mesías, M., & Morales, F. J. (2015). Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food and chemical toxicology*, 81, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.031>.
- Morales-Ramos, V., Osorio-Mirón, A. & Rodríguez-Campo, J. (2017). Innovaciones en el trapiche panelero: La producción de panela granulada. *Agroproductividad*, 10 (11), 41-47.
- Mujica, M., Guerra, M. & Soto, N. (2008). Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperatura de punteo sobre la calidad de la panela granulada. *Interciencia*, 33 (8), 598–603. ISSN: 0378-1844. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33933808>.
- Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., Mohammadi, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study. *Environmental science and pollution research international*, 27(24), 30558–30570. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09323-w>.
- Olimpio, J. (2014). Economia da rapadura. EMATER-PI. <http://www.sinterpi.org.br/artigos/economia-da-rapadura/> Accessed 6 April 2020.
- Ortiz, C., Solano, D., Villada, H., Mosquera, S. & Velasco, R. (2011). Extraction and drying of natural flocculants used in cane juice clarification. *Biotechnologia en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9 (2), 32-40.

- Ou, X., Huang, C., He, C. et al. (2007). Determination of Acrylamide in Sugar by Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography. *Food and fermentation industries*, 33 (11), 118–120. (In Chinese).
- Pan, M., Liu, K., Yang, J., Hong, L., Xie, X., & Wang, S. (2020). Review of Research into the Determination of Acrylamide in Foods. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9 (4), 524. <https://doi.org/10.3390/foods9040524>.
- Petrarca, M., Rosa, M., Queiroz, S. & Godoy, H. (2017). Simultaneous determination of acrylamide and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone in baby food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1522, 62–69. doi:10.1016/j.chroma.2017.09.052.
- Rozo, T. (2013). Manual técnico de buenas prácticas de manufactura (BPM) para el proceso tecnológico de producción de panela. Corhuila. [https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual Técnico BPM Trapiches.pdf/](https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual_Técnico_BPM_Trapiches.pdf/) Accessed 20 August 2020.
- Satín, M. (2018). Evaluación del contenido de acrilamida durante el procesamiento de panela granulada y propuesta de reducción (Undergraduate dissertation). Universidad de Piura, Piura, Perú.
- Şenyuva, H. & Gökmen, V. (2006). Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography–mass spectrometry method. *Food Chemistry*, 97 (3), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.005>.
- Solomon, S., Banerji, R., Shrivastava, A.K., Singh, P., Singh, I., Verma, M., Prajapati, C.P., Sawnani, A. (2006). Post-harvest deterioration of sugarcane and chemical methods to minimize sucrose losses. *Sugar Tech.* 8 (1), 74–78. <https://doi.org/10.1007/BF02943746>.
- Surma, M., Sadowska-Rociek, A., Cieřlik, E. & Sznajder-Katarzyńska. (2017). Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. *Microchemical Journal*, 131, 98–102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.021>.
- Vargas, J.J., Talero, Y.V., Trujillo, F.A. & Camelo, L.R. (2014). Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 5 (2), 99–105. doi: 10.19053/01217488.3664.
- Vargas, K. (2016). El aguapanela, una bebida muy rica y con muchas bondades. <https://www.elcampesino.co/el-aguapanela-una-bebida-muy-rica-y-con-muchas->

- bondades/ Accessed 14 April 2019.
- Velásquez, F., Espitia, J., Mendieta, O., Escobar, S. & Rodríguez, J. (2019). Non-centrifugal cane sugar processing: A review on recent advances and the influence of process variables on qualities attributes of final products. *Journal of Food Engineering*, 255, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.009>.
- Weerawatanakorn, M., Asikin, Y., Takahashi, M., Tamaki, H., Wada, K., Ho, C. T., & Chuekittisak, R. (2016). Physico-chemical properties, wax composition, aroma profiles, and antioxidant activity of granulated non-centrifugal sugars from sugarcane cultivars of Thailand. *Journal of food science and technology*, 53(11), 4084–4092. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2415-5>.
- WHO. World Health Organization. (2002). Instructions for electronic submission of data on chemical contaminants in foods – Appendix 4: Evaluation of low level contamination in foods, 51-52. ftp://ftp.ksph.kz/Chemistry_Food%20Safety/TotalDietStudies/Chemical.pdf/ Accessed 20 August 2020.
- Zhou, P., Zhao, Y., Liu, H., MA, Y., Li, X., Yang, X., & Wu, Y. (2013). Dietary exposure of the Chinese population to acrylamide. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26 (6), p 421–429. doi: 10.3967/0895-3988.2013.06.002.

CONCLUSÃO GERAL

Com base na revisão bibliográfica e nos experimentos desenvolvidos no presente estudo, conclui-se que a acrilamida é formada no açúcar não centrifugado durante as etapas de evaporação e concentração do caldo de cana onde ocorre o tratamento térmico acima de 120 °C que, juntamente com o conteúdo inicial de açúcares redutores e aminoácidos, favorecem a reação de Maillard, resultando na formação deste composto potencialmente carcinogênico e genotóxico.

Os valores obtidos quanto à ocorrência da acrilamida em amostras do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, México e Peru mostram que existe uma grande variação que pode ser atribuída: i) às mudanças nos teores dos precursores na cana-de-açúcar, como açúcares redutores e o aminoácido asparagina, que estão associados a genótipos de cana-de-açúcar, fertilização, colheita, tipos de solo, estágio de maturação, entre outros; ii) ao tempo e temperatura empregados durante o tratamento térmico, já que o processo é artesanal e pouco controlado; iii) e ao tipo de aglutinante. O ANC granulado apresentou os maiores níveis de acrilamida quando comparado com o produto em bloco. Amostras de ANC da Colômbia declaradas como orgânicas também apresentaram concentrações mais elevadas quando comparadas com as convencionais.

O consumo do ANC no Brasil é menor do que o da Colômbia, mas existe um risco potencial para a saúde em relação aos efeitos neoplásicos para grandes consumidores do Estado de Ceará. Por outro lado, os valores de MOE obtidos para a população Colombiana indicam um risco potencial para a saúde especialmente para crianças entre 1 e 4 anos de idade devido ao baixo peso corpóreo e alto consumo. Os resultados obtidos poderão contribuir com os órgãos reguladores para a definição de limites máximos desse contaminante neste tipo de produto alimentício como também para o estabelecimento de estratégias de mitigação, que podem basear-se no desenvolvimento de processos mais eficientes que empreguem um tempo de exposição menor às altas temperaturas, uso de vácuo que permita manter temperaturas de trabalho menores, modificação genética da cana de açúcar para diminuir o conteúdo de precursores, e uso da asparaginase imediatamente depois da moagem da cana.

Recomenda-se, em pesquisas futuras, realizar um estudo da cinética de formação e degradação da acrilamida e outros compostos induzidos termicamente durante o

processo de obtenção do ANC, assim como avaliar a influência dos diferentes tipos de aglutinantes (naturais e artificiais) no conteúdo final de acrilamida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVÉS, M. (2010). Method for obtaining with sugar from cane juice. Depositante: Alavés Bolaños, Mario. W O 2010/131937 A l. Depósito: 11 jan. 2010. Concessão: 18 nov. 2010.
- ALBISHRI, H.; EL-HADY, D. (2014). Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta*, v. 118, p. 129–136.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. (2018). Extraction and reliable determination of acrylamide from thermally processed foods using ionic liquid-based ultrasound-assisted selective microextraction combined with spectrophotometry. *Food Additives and Contaminants - Part A*, v. 35, n. 2, p. 222–232.
- ANASTASSIADES; M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D; SCHENCK, F. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. v. 86, p. 412-431.
- ANDAČIĆ, I. et al. (2020). Exposure of the Croatian adult population to acrylamide through bread and bakery products, *Food Chemistry*, v. 322, 126771, p. 1-8.
- ARISSETO, A. et al. (2007). Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 24, n. 3, p. 236–241.
- ARISSETO, A.; TOLEDO, M. C. (2006). Acrilamida em Alimentos : Uma Revisão. Acrylamide in Foods : A Review. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 2, p. 123–134.
- ARISSETO, A.; TOLEDO, M. C. (2008). Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 21, n. 1, p. 9–14.
- ASIKIN, Y. et al. (2016). Effects of different drying–solidification processes on physical properties, volatile fraction, and antioxidant activity of non-centrifugal cane brown sugar. *LWT - Food Science and Technology*, v. 66, p. 340-347.
- BACKE, W.; YINGLING, V.; JOHNSON, T. (2014). The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection - hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1334, p. 72-78.
- BARIŠIĆ, V. et al. (2020). 5-Hydroxymethylfurfural and acrylamide content of cocoa

- shell treated with high voltage electrical discharge. *Food Control*, v. 110, 107043, p. 1-9.
- BARÓN, W. (2016). Acrilamida – Estudio de Consumo en Alimentos Bogotanos. Dissertação (Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- BELAND, F. et al. (2015). Carcinogenicity of glycidamide in B6C3F1 mice and F344/N rats from a two-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*. v. 86, p. 104–115.
- BERGMARK, E. et al. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 130, p. 45–54.
- BERMUDO, E. et al. (2008). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products, *Talanta*, v. 76, n. 2, p. 389–394.
- CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2009). CAC/RCP 67-2009. Code of practice for the reduction of acrylamide in foods.
- CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2019). CL 2019/34-CS. Proyecto de norma para el jugo de caña de azúcar deshidratado no centrifugado. Roma.
- CASTELLANOS, O.; Torres, M.; FLORÉZ, D. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la panela y su agroindustria en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Colombia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12695/>. Acesso em: 20 August 2020.
- CASTLE, L.; ERIKSSON, S. (2005). Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 1, p. 274–84.
- CELIS, T. (2017). Un colombiano consume 19 kilos de panela cada año. https://www.agronegocios.co/agricultura/un-colombiano-consume-19-kilos-de-panela-cada-ano-2622598#/. Acesso em: 23 August 2020.
- CHEN, Q.; ZHAO, W.; FUNG, Y. (2011). Determination of acrylamide in potato crisps by capillary electrophoresis with quantum dot-mediated LIF detection. *Electrophoresis*, v. 32, n. 10, p. 1252-1257.
- CHENG, W. et al. (2009). Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 17, n. 3, p. 190–197.
- CIMPA. (1992). Manual de elaboración de panela y otros derivados de la caña. Disponible em:

- <https://www.researchgate.net/publication/306375615_MANUAL_DE_ELABORACION_DE_PANELA_Y_OTROS_DERIVADOS_DE_LA_CANA>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- COLINA, J. et al. (2012). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bebidas elaboradas con panela. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v. 62, n. 3, p. 303–310.
- CORPOICA. (2004). Composición de panela en bloque de acuerdo con muestras tomadas en diferentes regiones del país. Análisis realizados en laboratorios de CORPOICA-CIMPA entre 1988 y 2004. Centro de investigación Tibaitata.
- DE PAOLA et al. (2017). Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection. *Food Chemistry*, v. 217, p. 191-195.
- DEZFULY, M.; MAHADEVIAIAH; DEMAPPA, T. (2013). Effective of Different Flocculants on Fresh and Stale Sugarcane Juice Clarification. *Research Journal of Recent Sciences*. v. 2, n. 7, p. 48-52.
- DIBABA et al. (2018). Acrylamide occurrence in *Keribo*: Ethiopian traditional fermented beverage. *Food Control*, v. 86, p. 77-82.
- DINERO (2014). El negocio de la panela crece y se derrite a la vez. Disponível em: <<https://www.dinero.com/empresas/articulo/balance-del-sector-panelero-colombia-2014/202561>>. Acesso em: 8 jul. 2019.
- EC. EUROPEAN COMMISSION. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_acrylamide_out131_en.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- EC. EUROPEAN COMMISSION. (2017). Commission Regulation (EU) 2017/2158. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*. v. 13, n. 6, p. 1-321.
- ELIAS, A. et al. (2017). Acrylamide in commercial foods and intake by infants in Estonia. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 34, n. 11, p. 1875–1884.
- EL-ZINEY, M.; AL-TURKI, A.; TAWFIK, M. (2009). Acrylamide status in selected traditional Saudi foods and infant milk and foods with estimation of daily exposure.

- American Journal of Food Technology*, v. 4, n. 5, p. 177–91.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (s.d.). Rapadura. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fjighhp202wyiv80sq98yqyvgmia8.html>>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (2014). CPP Fabricação de Açúcar Mascavo, Melado e Rapadura. 1ª edição. Para Centrais Elétricas Brasileiras S.A- Eletrobras. Rio de Janeiro.
- ESPOSITO, F. et al. (2017). Determination of acrylamide levels in potato crisps and other snacks and exposure risk assessment through a Margin of Exposure approach. *Food and Chemical Toxicology. Part A*, v. 108, p. 249–256.
- EURACHEM. (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Segunda Edição. ISBN 978-91-87461-59-0. Disponível em: www.eurachem.org.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (1994). Sugar crops and sweeteners and derived products. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/faodef/fdef03e.HTM>>. Acesso em: 8 jul. 2020.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. (2014). Procesados de productos diversos. Fichas técnicas. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au171s.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FAOSTAT. (2017). New Foods Balances. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FDE. FOOD DRINK EUROPE. (2019). Acrylamide Toolbox. Disponível em: <https://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- FENG, C.; LU, C. (2011). Modification of major plasma proteins by acrylamide and glycidamide: Preliminary screening by nano liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 684, n. 1–2, p. 89–95.
- GALEŠA, K. et al. (2008). Carcinogenicity of acrylamide: A computational study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 8720–8727.
- GAO, J. et al. (2016). Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 87, p. 97–102.
- GHIASVAND, A.; HAJIPOUR, S. (2016). Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas

- chromatography-flame ionization detection. *Talanta*, v. 146, p. 417-422.
- GÖKMEN, V. (2016). Chapter 5. Acrylamide Formation in Foods: Role of Composition and Processing. Em: *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. Springer. 1 ed. p. 67–80.
- GÓMEZ-NARVÁEZ, F. et al. (2019). Occurrence of acrylamide and other heat-induced compounds in panela: Relationship with physicochemical and antioxidant parameters. *Food Chemistry*, v. 301, p. 1–9.
- GRANVOGL, M. et al. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – A minor but potent precursor in acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 15, p. 4751-4757.
- HARISH NAYAKA, M. et al. (2009). Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar. *Food Chemistry*, v. 115, n. 1, p. 113–118.
- IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (1994). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Acrylamide. *IARC Monographs*, v. 60, p. 389-433.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. (2011). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>/ Acesso em: 20 August 2020.
- ICBF. INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR. (2020). Encuesta nacional de la situación nutricional ENSIN 2015. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/libro-ensin-2015.pdf>/ Acesso em: 20 Agosto 2020.
- IQBAL, M. et al. (2017). Total phenolic, chromium contents and antioxidant activity of raw and processed sugars. *Information Processing in Agriculture*, v. 4, n. 1, p. 83-89.
- INS. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. (2012). Concepto científico acrilamida en panela. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia. Disponible em: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Concepto-poliacrilamida-en-panela.pdf>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- INVIMA. INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS. (2018). Informe de resultados del plan nacional subsectorial de vigilancia y control de acrilamida en alimentos procesados durante los años 2015-2016. Gobierno de Colombia. Disponible em:

- <<https://www.invima.gov.co/documents/20143/440892/INFORME-ACRILAMIDA.pdf/7c18507c-d593-44c6-eb32-93be35fa8378?t=1560290190255>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- JAFFÉ, W. (2012). Health Effects of Non-Centrifugal Sugar (NCS): A Review. *Sugar Tech*, v. 14, p. 87–94.
- JAFFÉ, W. (2013). Non centrifugal sugar: world production and trade. Disponível em: <<http://www.panelamonitor.org/documents/558/non-centrifugal-sugar-world-production-and-trade/>>. Acesso em: 8 jul. 2020.
- JECFA. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. (2005). Safety evaluation of certain contaminants in food. Sixty-fourth meeting. World Health Organization.
- JECFA. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting. World Health Organization.
- KADAM, U. et al. (2008). Antioxidant activity in sugarcane juice and its protective role against radiation induced DNA damage. *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 1154–1160.
- KAWAHARA, J. et al. (2018). Estimation of long-term dietary exposure to acrylamide of the Japanese people. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 35, n. 9, p. 1689–1702.
- KOLŠEK, K.; SOLLNER DOLENC, M.; MAVRI, J. (2013). Computational study of the reactivity of bisphenol A-3,4-quinone with deoxyadenosine and glutathione. *Chemical Research in Toxicology*, v. 26, p. 106–111.
- KOYAMA, N. et al. (2011). Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, n. 1, p. 11–19.
- KRSKA et al. (2012). Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 139–162.
- LARRAHONDO, J. (1995). Calidad de la Caña de Azúcar. Em: CENICAÑA (Ed.). El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. Tercera ed.
- LI, D. et al. (2016). Metabolism of Acrylamide: Interindividual and Interspecies Differences as Well as the Application as Biomarkers. *Current Drug Metabolism*, v. 17, p. 317–326.
- LIMA, R. (2012). Processo de clarificação de caldo de cana-de-açúcar aplicando elétrons

- acelerados. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- LINEBACK, D.; COUGHLIN, J.; STADLER, R. (2012). Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 3, p. 15–35.
- LOIRET, F. et al. (2009). Inoculation of sugarcane with *Pantoea* sp. increases amino acid contents in shoot tissues; serine, alanine, glutamine and asparagine permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of the bacterium. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, n. 11, p. 1152–1161.
- MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. (2006). Rapid Sample Preparation Method for LC–MS/MS or GC–MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 19, p. 7001-7008.
- MATOSO, V. et al. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, v. 283, p. 422-430.
- MAVRI, J. (2013). Can the chemical reactivity of an ultimate carcinogen be related to its carcinogenicity? An application to propylene oxide. *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 1, p. 479–485.
- MEEROD, K.; WEERAWATANAKORN, M.; PANSAK, W. (2019). Impact of Sugarcane Juice Clarification on Physicochemical Properties, Some Nutraceuticals and Antioxidant Activities of Non-centrifugal Sugar. *Sugar Tech*, v. 21, n. 3, p. 471–480.
- MESIAS, M. et al. (2020). Formation of acrylamide and other heat-induced compounds during panela production. *Foods*, v.9, n.4: 531, p. 1-20.
- MESIAS, M. et al. (2019). Reassessment of acrylamide content in breakfast cereals. Evolution of the Spanish market from 2006 to 2018. *Food Control*, v. 105, p. 94–101.
- MESÍAS, M.; MORALES, F. J. (2015). Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food and chemical toxicology*, v. 81, p. 104–110.
- MICHALAK, J.; GUJSKA, E.; KUNCEWICZ, A. (2013). RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 32, n. 1, p. 68–73.

- MOJSKA, H. et al. (2010). Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2090–2096.
- MORALES-RAMOS, V.; OSORIO-MIRÓN, A.; RODRÍGUEZ-CAMPO, J. (2017). Innovaciones en el trapiche panelero: La producción de panela granulada. *Agroproductividad*, v. 10, n. 11, p. 41-47.
- MOSQUERA, S.; CARRERA, J.; VILLADA, H. (2007). Variables que afectan la calidad de la panela procesada en el Departamento del Cauca. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*. v. 5, n. 1, p. 17-27.
- MOTTRAM, D.; WEDZICHA, B.; DODSON, A. (2002). Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, v. 419, p. 448–449.
- MUJICA, M.; GUERRA, M.; SOTO, N. (2008). Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperatura de punteo sobre la calidad de la panela granulada. *Interciencia*, v. 33, n. 8, p. 598–603.
- NEMATOLLAHI et al. (2019). Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science*, v. 87, p. 157-164.
- NEMATOLLAHI, A. et al. (2020). Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study. *Environmental science and pollution research international*, v. 27, n. 24, p. 30558–30570.
- NORMANDIN, L. et al. (2013). Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology*, v. 57, p. 75–83.
- OLIMPIO, J. (2014). Economia da rapadura. EMATER-PI. Disponível em: <<http://www.sinterpi.org.br/artigos/economia-da-rapadura/>>. Acesso em: 6 abril 2020.
- OLIVIERA, J. C.; NASCIMENTO, R. de J.; BRITTO, W. S. F. (2007). Demonstração dos custos cadeia produtiva da rapadura: Estudo realizado no Vale do São Francisco. *Custos e @gronegocio*, v. 3, p. 79-99.
- ÖLMEZ, H. et al. (2008). A survey of acrylamide levels in foods from the Turkish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 564–568.
- ORACZ, J.; NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, v. 86, p. 23–34.
- ORTIZ et al. (2011). Extraction and drying of natural flocculants used in cane juice clarification. *Biotecnologia en el sector agropecuario y agroindustrial*, v. 9, n. 2, p.

32-40.

- OSORIO, G. (2007). Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas -BPA- y Buenas Prácticas de Manufactura -BPM-en la Producción de Caña y Panela. Primera ed. Edited by C. Print. Medellín. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a1525s.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- OU, X. et al. (2007). Determination of Acrylamide in Sugar by Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography. *Food and fermentation industries*, v. 33, n. 11, p. 118–120.
- PACETTI, D. et al. (2015). Acrylamide levels in selected Colombian foods. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, v. 8, n. 2, p. 99–105.
- PAES, J.; FERNANDES, A.; BARBOSA, C. (2003). Produção de açúcar mascavo, melado e rapadura. Livro: *Projetos de Empreendimentos Agroindustriais - Produtos de origem Vegetal*. Ed. 1, Capítulo 4. Editora UFV. DOI: 10.13140/RG.2.1.3198.5524.
- PAL, M. et al. (2018). HPLC-UV Quantitative Analysis of Acrylamide in Snack Foods of India. *Defence Life Science Journal*, v. 4, n. 1, p. 45–54.
- PAN, M. et al. (2020). Review of Research into the Determination of Acrylamide in Foods. *Foods*, v. 9, n. 4, 524, p. 1-20.
- PAULSSON, B. et al. (2003). Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 535, n. 1, p. 15–24.
- PAYET, B.; SING, A.; SMADJA, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 26, p. 10074–9.
- PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, M. (2017). Chapter 19. Mitigation of Acrylamide Formation in Highly Consumed Foods. In: *Global Food Security and Wellness*. 1 ed. Springer, p. 357–372.
- PETRARCA et al. (2017). Simultaneous determination of acrylamide and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone in baby food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1522, p. 62-69.
- PIVATO, A. (2008). Fibras para SPME (Microextração em fase sólida) recobertas com novos ormosils sol-gel. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de química. Departamento de química analítica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- POURMAND, E.; GHAEMI, E.; ALIZADEH, N. (2017). Determination of acrylamide in potato-based foods using headspace solid-phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled with ion mobility spectrometry: A heat treatment study. *Analytical Methods*, v. 9, p. 5127–5134.
- PUNDIR, C.; YADAV, N.; CHHILLAR, A. (2019). Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 85, p. 211–225.
- QUEZADA-MORENO, W.; GALLARDO-AGUILAR, I. (2014). Clarificación del jugo de caña mediante el empleo de plantas mucilaginosas. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, v. 48, n. 3, p. 41-48.
- RODRÍGUEZ, G. (2004). La agroindustria rural de la panela en Colombia: roles, problemática y nuevos retos. *Innovación y Cambio Tecnológico*. Disponible em: <<http://www.panelamonitor.org/documents/180/la-agroindustria-rural-de-la-panela-en-colombia-ro/>>. Acceso em: 13 jul. 2020.
- ROSÉN, J.; HELLENÄS, K. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, v. 127, n. 7, p. 880-882.
- ROZO, T. (2013). Manual técnico de buenas prácticas de manufactura (BPM) para el proceso tecnológico de producción de panela. Corhuila. Disponible em: [https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual Técnico BPM Trapiches.pdf](https://www.onfandina.com/images/Publicaciones/Panela_/Manual_Técnico_BPM_Trapiches.pdf). Acceso em: 13 jul. 2020.
- RUSSO, M. et al. (2014). Rapid and simple determination of acrylamide in conventional cereal-based foods and potato chips through conversion to 3-[bis(trifluoroethanoyl)amino]-3-oxopropyl trifluoroacetate by gas chromatography coupled with electron capture and ion trap mass spect. *Food Chemistry*, v. 146, p. 204–211.
- SAHU, A.; PAUL, B. (1998). The role of dietary whole sugar-jaggery in prevention of respiratory toxicity of air toxics and in lung cancer. *Toxicology Letters*, v. 95, n. 1, p. 154.
- SANTAMARIA, H. R. (2012). Evaluación mediante indicadores productivos y energéticos de tres módulos de producción de panela granulada. Trabajo de Conclusão de Curso (Engenharia Mecânica-Elétrica). Facultad de Ingeniería. Área Departamental de Ingeniería Mecánico-Eléctrica. Universidad de Piura, Piura, Peru.
- SATÍN, M. (2018). Evaluación del contenido de acrilamida durante el procesamiento de

- panela granulada y propuesta de reducci3n. Trabalho de Conclus3o de Curso (Engenharia Mec3nica-El3trica). Facultad de Ingenier3a. 3rea Departamental de Ingenier3a Mec3nico-El3trica. Universidad de Piura, Piura, Peru.
- SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. (2016). O processo de fabricaça3o da rapadura. Dispon3vel em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-processo-de-fabricacao-da-rapadura,9be9438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- ŞENYUVA, H.; GÖKMEN, V. (2006). Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography–mass spectrometry method. *Food Chemistry*, v. 97, n. 3, p. 539-545.
- SIROT, V. et al. (2012). Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 889–894.
- SOLÍS, J. et al. (2006). Descripci3n de un proceso tecnificado para la elaboraci3n de piloncillo a partir de caña de azúcar. *e-Gnosis*, v. 4, n. 1, p. 1–8.
- SOLOMON, S. et al. (2006). Post-harvest deterioration of sugarcane and chemical methods to minimize sucrose losses. *Sugar Tech.* v. 8, n. 1, p. 74–78.
- STADLER, R. et al. (2002). Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, v. 419, p. 449–450.
- STADLER, R.; GOLDMANN, T. (2008). Chapter 20 Acrylamide, Chloropropanols and Chloropropanol Esters, Furan. Handbook: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Edited by Yolanda Pic3, Elsevier, v. 51, p. 705-732.
- STADLER, R.; STUDER, A. (2015). Chapter 1. Acrylamide Formation Mechanisms. In: *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. Elsevier. p. 1–17.
- STADLER, R; SCHOLZ, G. (2004). Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, v. 62, n. 12, p. 449-467.
- STEFANOVIC, S.; ĐORDEVIC, V.; JELUSIC, V. (2017). Rapid and reliable QuEChERS-based LC-MS/MS method for determination of acrylamide in potato chips and roasted coffee. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 85, 012010, p. 1-6.
- SUNG, W. C. et al. (2020). Influence of caramel and molasses addition on acrylamide

- and 5-hydroxymethylfurfural formation and sensory characteristics of non-centrifugal cane sugar during manufacturing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, n. 12, p. 4512-4520.
- SURMA, M. et al. (2017). Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. *Microchemical Journal*, v.131, p. 98-102.
- TAREKE, E. et al. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 17, p. 4998–5006.
- VARGAS, J. et al. (2014). Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida. *Revista Ciencia en Desarrollo*, v. 5, n. 2, p. 99-106.
- VARGAS, K. (2016). El aguapanela, una bebida muy rica y con muchas bondades. Disponível em: <<https://www.elcampesino.co/el-aguapanela-una-bebida-muy-rica-y-con-muchas-bondades/>>. Acesso em: 14 abr. 2019.
- VELASQUEZ, F. et al. (2019). Non-centrifugal cane sugar processing: A review on recent advances and the influence of process variables on qualities attributes of final products. *Journal of Food Engineering*, v. 255, p. 32-40.
- VIRK-BAKER, M. et al. (2014). Dietary acrylamide and human cancer: A systematic review of literature. *Nutrition and Cancer*, v. 66, n. 5, p. 774–790.
- WAWRZYNIAK, R.; JASIEWICZ, B. (2019). Straightforward and rapid determination of acrylamide in coffee beans by means of HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry*, v. 301, 125264, p. 1-6.
- WEERAWATANAKORN, M. et al. (2016). Physico-chemical properties, wax composition, aroma profiles, and antioxidant activity of granulated non-centrifugal sugars from sugarcane cultivars of Thailand. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, p. 4084–4092.
- WEISSHAAR, R. (2004). Acrylamide in heated potato products - Analytics and formation routes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 106, n. 11, p. 786–792.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2002). Instructions for electronic submission of data on chemical contaminants in foods – Appendix 4: Evaluation of low level contamination in foods, 51-52. ftp://ftp.ksph.kz/Chemistry_Food%20Safety/TotalDietStudies/Chemical.pdf/. Acesso em: 20 August 2020.
- YANG, T.; HUANG, K. (1983). The preliminary study of free amino acids in green tops

- of sugar cane. Disponível em: <[http://www.issct.org/pdf/proceedings/1983/1983Tao-tze The Preliminary Study of Free Amino Acids in Green Tops of Sugar Cane.pdf](http://www.issct.org/pdf/proceedings/1983/1983Tao-tze%20The%20Preliminary%20Study%20of%20Free%20Amino%20Acids%20in%20Green%20Tops%20of%20Sugar%20Cane.pdf)>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- YAYLAYAN, V. A.; WNOROWSKI, A.; PEREZ, L. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1753–1757.
- YOSHIOKA et al., (2019). A highly sensitive determination method for acrylamide in beverages, grains, and confectioneries by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 294, p. 486-492.
- ZHOU, P. et al. (2013). Dietary exposure of the Chinese population to acrylamide. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 26, n. 6, p. 421–429.
- ZYZAK, D. et al. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 4782–4787.